

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire du syndrome CAID : Mise en  
évidence des rôles non canoniques de SGO1 dans la  
régulation de la signalisation TGF- $\beta$  et de l'épigénomique.**

Par  
Jessica Piché

Département de Biochimie, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat (Ph.D.)  
en Biochimie

10 juillet, 2019

© Jessica Piché, 2019

Université de Montréal

Unité académique : Département de Biochimie, Faculté de Médecine

---

Cette thèse intitulée

**Caractérisation moléculaire du syndrome CAID : Mise en évidence des rôles non canoniques de SGO1 dans la régulation de la signalisation TGF- $\beta$  et de l'épigénomique.**

Présenté par

**Jessica Piché**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

**Nikolaus Heveker**

Président-rapporteur

**Gregor Andelfinger**

Directeur de Recherche

**Zoha Kibar**

Membre du jury

**Nicolas Pilon**

Examineur externe

## Résumé

Les contractions rythmiques résultent de l'activité stimulatrice du nœud sinusal dans le cœur et des cellules interstitielles de Cajal (CICs) dans les intestins. Nous avons découvert un nouveau syndrome résultant d'une combinaison de la maladie du nœud sinusal (MNS) et de la pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC). Ce syndrome, que nous avons nommé Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia (CAID), résulte d'une mutation récessive du gène *SGO1* (K23E). Cependant, les rôles connus de SGO1 n'expliquent pas l'apparition postnatale du syndrome ni la pathologie spécifique, suggérant que des rôles non canoniques de SGO1 conduisent aux manifestations cliniques observées. Cette hypothèse est supportée par la comparaison de CAID avec les autres cohésinopathies qui présentent principalement des phénotypes développementaux sans ou avec des défauts légers du cycle cellulaire.

Ce projet visait à une découverte non biaisée des mécanismes non canoniques expliquant le syndrome CAID en utilisant le dogme de la biologie moléculaire (ADN→ARNm→protéine) comme ligne directrice. Pour ce faire, nous avons effectué des criblages multi-omiques sur des fibroblastes de peau de patients CAID et de contrôles sains. Les résultats des criblages ont été validés par électrophysiologie, étude des voies de signalisation pertinentes, immunohistochimie, pyroséquençage des rétrotransposons *LINE-1* et quantification des marques d'histones.

Nos études multi-omiques ont confirmé des changements dans la régulation du cycle cellulaire, mais aussi dans la conduction cardiaque et la fonction des muscles lisses. Plus spécifiquement, plusieurs canaux potassiques étaient sous-régulés. L'électrophysiologie a confirmé une diminution du courant potassique rectifiant entrant (IK<sub>1</sub>). L'immunohistochimie des coupes intestinales de patients CAID a confirmé l'augmentation de l'expression de SGO1 et BUB1, un régulateur de la voie de signalisation TGF-β. De plus, la voie canonique de TGF-β est augmentée et est découplée de la voie non canonique. Au niveau épigénétique, une signature unique d'hyperméthylation et de fermeture de la chromatine a été observée. Ce qui est soutenu par l'augmentation de la méthylation de H3K9me3 et de H3K27me3.

En conclusion, le syndrome CAID est associé à plusieurs changements ayant possiblement un effet cumulatif plutôt que d'une seule voie de signalisation dérégulée. Nos résultats désignent la perturbation du courant IK<sub>1</sub>, la dérégulation de la signalisation TGF-β,

l'hyperméthylation de l'ADN et la compaction de la chromatine comme éléments conducteurs potentiels des manifestations cliniques observées. La voie TGF- $\beta$  et les changements épigénétiques peuvent être ciblées par des médicaments existants, constituant ainsi des cibles thérapeutiques prometteuses pour le traitement du syndrome CAID.

**Mots-clés:** Syndrome CAID (chronic atrial and intestinal dysrhythmia), Maladie du nœud sinusal (MNS), pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC), cohésinopathies, Shugoshin-1 (SGO1), signalisation TGF- $\beta$ , épigénétique.



## Abstract

Rhythmic contractions are driven by the pacemaker activity of the cardiac sinus node and the intestinal interstitial cells of Cajal (ICC). We have discovered a new syndrome resulting from a combination of sick sinus syndrome (SSS) and chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO). This syndrome, which we have named Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia (CAID), results from a recessive mutation in the *SGO1* gene (K23E). However, the known roles of SGO1 do not explain the postnatal onset of the syndrome nor the specific pathology, suggesting that non-canonical roles of SGO1 lead to the clinical manifestations observed. This hypothesis is supported by the comparison of CAID with other cohesinopathies which mainly exhibit developmental phenotypes without or with mild cell cycle defects.

This project aimed towards an unbiased discovery of noncanonical mechanisms explaining CAID using the molecular biology dogma (DNA→mRNA→protein) as a guideline. We performed multi-omic screens on skin fibroblasts from CAID patients and healthy controls. Screening results were validated by electrophysiology, study of relevant signaling pathways, immunohistochemistry, LINE-1 retrotransposon pyrosequencing, and histone marks quantification.

Our multiomics analyses confirmed changes in cell cycle regulation, but also in cardiac conduction and smooth muscle function. More specifically, several potassium channels were downregulated. Electrophysiology studies confirmed a decrease in the inward rectifier potassium current (IK1). Immunohistochemistry in CAID patient's intestinal sections confirmed overexpression of SGO1 and BUB1, a regulator of TGF- $\beta$  signaling pathway. Additionally, the canonical TGF- $\beta$  signaling was increased and decoupled from noncanonical signaling. At the epigenetic level, CAID patient fibroblasts have a unique signature of hypermethylation and chromatin closure. This is supported by the increased methylation of H3K9me3 and H3K27me3.

In conclusion, CAID syndrome is associated with several changes that, may have a cumulative effect rather than a single deregulated signaling pathway. Our results reveal the disturbance of the IK<sub>1</sub> current, the deregulation of TGF- $\beta$  signaling, DNA hypermethylation and chromatin accessibility changes as potential conductors of intestinal and cardiac manifestations of CAID syndrome. In particular, the TGF- $\beta$  pathway and epigenetic changes, may be targeted

by existing drugs, thus constituting promising therapeutic targets for the treatment of CAID syndrome.

**Keywords:** CAID syndrome (chronic atrial and intestinal dysrhythmia), Sick sinus syndrome (SSS), chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO), cohesinopathies, Shugoshin-1 (SGO1), TGF- $\beta$  signaling, epigenetics.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures .....	xii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xxiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 – Système circulatoire.....	3
1.1.1 – Structure et rôles du système circulatoire .....	3
1.1.2 – Structure du cœur.....	4
1.1.3 –Cardiogenèse.....	6
1.1.4 - Voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle de la cardiogenèse .....	7
1.1.5 - Régulation épigénétique de la cardiogenèse.....	10
1.1.6 - Dérégulation épigénétique impliquées dans les maladies cardiaques .....	12
1.2 – Système de conduction .....	16
1.2.1 – Anatomie du système de conduction .....	16
1.2.2 – Anatomie et automaticité du nœud sinusal .....	16
1.2.3 – Contrôle génétique du développement du nœud sinusal.....	18
1.2.4 – Fonctions du nœud sinusal.....	20
1.2.5 – Potentiel d'action cardiaque.....	20
1.2.6 – Électrophysiologie : Principe et application en recherche.....	22
1.3 – Maladie du nœud sinusal (MNS).....	24
1.3.1 – Prévalence de MNS.....	24
1.3.2 – Étiologie de MNS .....	24
1.3.3 – Symptômes et diagnostic de MNS.....	25
1.3.4 – Traitements de MNS .....	25

1.4	– Système gastro-intestinal .....	26
1.4.1	- Structure et rôles du système gastro-intestinal .....	26
1.4.2	Développement embryonnaire du système gastro-intestinal .....	28
1.4.3	Voies de signalisation et régulation transcriptionnelle du développement du système gastro-intestinal .....	29
1.4.4	– Régulation épigénétique du développement du système gastro-intestinal .....	31
1.4.5	– Dérégulations épigénétiques impliquées dans les maladies gastro-intestinales .....	32
1.5	– Système nerveux entérique .....	34
1.5.1	Anatomie du système nerveux entérique .....	34
1.5.2	– Développement du système nerveux entérique.....	36
1.5.3	– Contrôle génétique du développement du système nerveux entérique .....	38
1.5.4	- Fonctions du système nerveux entérique.....	40
1.5.5	– Cellules interstitielles de Cajal.....	40
1.5.6	– Contrôle génétique du développement des cellules interstitielles de Cajal .....	41
1.5.7	- Fonctions des cellules interstitielles de Cajal .....	41
1.5.8	Potentiels d'action gastro-intestinaux .....	42
1.6	– Pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) .....	46
1.6.1	– Prévalence de la POIC .....	46
1.6.2	– Étiologie de POIC .....	46
1.6.3	– Symptômes et diagnostic de POIC .....	47
1.6.4	– Traitement de POIC .....	48
1.7	– Syndrome CAID .....	49
1.8	– Complexe de la cohésine et cohésinopathies .....	58
1.8.1	– Complexe de la cohésine .....	58
1.8.2	– Rôle du complexe de la cohésine dans la régulation du cycle cellulaire .....	59
1.8.3	– Rôles du complexe de la cohésine dans la régulation de la transcription .....	60
1.8.4	– Cohésinopathies .....	60
1.9	– Caractérisation et rôles de SGO1 .....	61
1.9.1	– Interactions protéine-protéine de SGO1 .....	62
1.9.2	– Rôles de SGO1 dans le maintien de la cohésion au cours de la mitose.....	64

1.9.3 – Mécanisme moléculaire de la protection des complexes de cohésion centromérique par SGO1 et SGO2 .....	64
1.9.4 – Localisation centromérique de SGO1 via la régulation des complexes CPC et SAC (spindle assembly checkpoint) .....	65
1.9.5 – Autres rôles de SGO1 .....	66
1.9.6 – Caractérisation de l'expression de SGO1 .....	67
1.10 – La voie de signalisation TGF- $\beta$ .....	71
1.10.1 – Voie canonique de la signalisation TGF- $\beta$ .....	72
1.10.2 – Voie non canonique de la signalisation TGF- $\beta$ .....	72
1.10.3 – Manifestations cliniques associées à la signalisation TGF- $\beta$ .....	73
1.10.4 – Interaction entre la voie de signalisation TGF- $\beta$ et le complexe de la cohésine .....	74
Chapitre 2: Hypothèses et objectifs .....	76
2.1 – Problématique .....	76
2.2 – Hypothèses.....	76
2.3 – Objectifs et méthodologie générale .....	76
Chapitre 3: Article 1.....	78
Abstract .....	80
Introduction.....	81
Structure and role of the cohesin complex and its regulators in chromosome segregation ..	82
Cohesinopathies: Common and distinct phenotypes .....	83
Non-cohesion related functions of the cohesin complex and involvement in cohesinopathies .....	86
Gene dosage effects in cohesinopathies.....	88
Epigenetic regulation in cohesinopathies.....	89
TGF- $\beta$ and cohesinopathies .....	90
SGO1 functions.....	91
Effects of SGO1 alterations in human pathologies.....	93
Possible impact of SGO1 mutation on sinus node and gut development and functions.....	94
Conclusion .....	98

Acknowledgements.....	99
References.....	100
Tables.....	109
Table references .....	112
Figures.....	116
Chapitre 4: Article 2.....	119
Contributions détaillées des co-auteurs .....	122
Abstract.....	127
Introduction.....	128
Results.....	130
Transcriptome profiling of CAID syndrome .....	130
Proteome profiling of CAID syndrome .....	131
Gastrointestinal histology of CAID syndrome .....	132
Electrophysiology of potassium channels in CAID fibroblasts.....	132
Characterization of TGF- $\beta$ signaling in CAID patient fibroblasts.....	133
Epigenomics of CAID syndrome.....	134
Discussion.....	135
Acknowledgements.....	139
Material and Methods .....	140
References.....	149
Tables.....	154
Figures.....	164
Chapitre 5: Discussion et conclusion.....	176
5.1 – Le syndrome CAID dans le spectre des cohésinopathies .....	176
5.2 – Caractérisation du transcriptome du syndrome CAID.....	178
5.3 – Caractérisation du protéome du syndrome CAID.....	181
5.4 – Histologie gastro-intestinale des patients CAID.....	182
5.5 – Électrophysiologie des canaux potassiques dans les fibroblastes CAID.....	183
5.6 – Caractérisation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ dans les fibroblastes CAID...	184
5.7 – Caractérisation de l'épigénome du syndrome CAID .....	186

5.8	– Le syndrome CAID dans le spectre des dysrythmies cardiaque et gastro-intestinale	188
5.9	– Génération des modèles murins du syndrome CAID .....	190
5.10	– Intégration et modèle mécanistique du syndrome CAID.....	192
5.11	– Limitations .....	193
5.12	– Perspectives.....	195
5.13	– Conclusion .....	197
Bibliographie.....		198
Annexe 1 : Caractérisation du patron d’expression de SGO1 dans les fibroblastes de sujets contrôle, hétérozygote et homozygote pour la mutation K23E. ....		i
Annexe 2 : Caractérisation des phénotypes cellulaires des fibroblastes contrôles, hétérozygotes et homozygotes pour la mutation SGO1 K23E.....		ii
Annexe 3 : Top 10 des gènes différentiellement régulés (ARNm) chez les fibroblastes de peau des patients CAID à passage précoce (p8) et tardif (p14) .....		iv
Annexe 4 : Corrélations des analyses de méthylation de l’ADN et de compaction de la chromatine avec les analyses de transcriptomique .....		ix
Annexe 5 : Résultats de quantification des marques d’histones .....		xi

# Liste des tableaux

## Chapitre 3

Table 1. Summary of clinical characteristics of Cohesinopathies.....	109
--	-----

## Chapitre 4

Table 1. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed genes in RNAseq at early passage (p8).....	154
---	-----

Table 2. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed genes in RNAseq at late passage (p14). ....	155
--	-----

Table 3. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed proteins in SILAC at early passage (p8).....	156
---	-----

Table 4. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed proteins in SILAC at late passage (p14). ....	157
--	-----

Table 5. Biological functions (GO analysis) associated with differentially methylated genes in RRBS at early passage (p8). ....	158
---	-----

Table 6. Biological functions (GO analysis) associated with differentially methylated genes in RRBS at late passage (p14).....	159
--	-----

Table 7. Biological functions (GO analysis) associated with Tn5 peaks in ATAC-seq at early passage (p8).....	160
--	-----

Table 8. Biological functions (GO analysis) associated with Tn5 peaks in ATAC-seq at late passage (p14).....	161
--	-----

Table 9. Primers list for RT PCR validations. ....	162
--	-----

Table 10. <i>LINE-1</i> pyrosequencing primers. ....	163
--	-----

## Annexe 3

Tableau 1. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage précoce (p8) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.....	iv
---	----

Tableau 2. 10 gènes les plus différentiellement surexprimés à passage précoce (p8) chez les fibroblastes de peau des patients CAID. ....	v
--	---

Tableau 3. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage tardif (p14) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.....	vi
---	----



<b>Tableau 4. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage tardif (p14) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.....</b>	<b>vii</b>
--	------------

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1. Circulation sanguine chez l'humain. ....	3
Figure 2. Représentation schématique de la structure et des différents composants du cœur humain ainsi que les types cellulaires les constituants .....	5
Figure 3. Développement et régulation de la cardiogenèse. ....	7
Figure 4. Voies de signalisation impliquées dans la spécification des cellules progénitrices cardiaques.....	8
Figure 5. Cascades de signalisation impliquant les HDACs de classe I et II dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.....	13
Figure 6. Contrôle génétique du développement du nœud sinusal.....	19
Figure 7. Phases du potentiel d'action cardiaque. ....	21
Figure 8. Méthodes de patch clamp.....	23
Figure 9. Structure et glandes du système gastro-intestinal humain (A) et structures de la paroi intestinale (B).....	27
Figure 10. Facteurs de transcription exprimés dans l'endoderme et le mésoderme qui régulent dans la régionalisation du système gastro-intestinal chez le poulet. ....	30
Figure 11. Structure du système nerveux entérique. ....	34
Figure 12. Schéma des différents types de circuits neuronaux présents dans le SNE. ....	36
Figure 13. Colonisation initiale du tractus gastro-intestinal chez la souris par des cellules dérivées de la crête neurale entérique.....	38
Figure 14. Différenciation des cellules neuronales et gliales du système nerveux entérique. ....	39
Figure 15. Structure et localisation des différents types de CICs.....	41
Figure 16. Potentiel d'actions (A) à ondes lentes (B) en pics. ....	43
Figure 17. Forme des potentiels d'action cardiaques et gastro-intestinaux dans les différentes régions.....	45
Figure 18. Représentation graphique des scores d'homozygoties de 12 patients canadiens-français et du patient suédois.....	50

Figure 19. Histologie intestinale des patients CAID. ....	53
Figure 20. Analyse par microscopie confocale du patron d'expression de SGO1 pendant la mitose dans les fibroblastes de peau des patients CAID. ....	54
Figure 21. Analyse quantitative de la microscopie confocale. ....	55
Figure 22. Phénotypes cellulaires du syndrome CAID. ....	56
Figure 23. Expression spatiotemporelle et étude fonctionnelle de <i>sgo1</i> chez le poisson-zèbre. (1).....	57
Figure 25. Isoformes de SGO1. ....	61
Figure 26. Représentation schématique de l'isoforme A2. ....	62
Figure 27. Sites d'interaction entre SGO1 et SET. ....	63
Figure 28. Motifs PXVXL/I de SGO1. ....	63
Figure 29. Mécanisme moléculaire de la protection du complexe de cohésion centromérique par SGO1 au cours de la mitose chez les mammifères. ....	65
Figure 30. Localisation de <i>SGO1</i> aux centromères. Cette localisation dépend de son interaction avec plusieurs facteurs. ....	66
Figure 31. Patron d'expression de SGO1 dans le colon humain normal. ....	67
Figure 32. Carte allélique de la souris <i>Sgo1</i> <sup>+/LacZ</sup> . ....	67
Figure 33. Patron d'expression de SGO1 dans le cœur en développement du modèle murin <i>Sgo1</i> <sup>+/LacZ</sup> . ....	68
Figure 34. Patron d'expression de SGO1 dans l'intestin en développement du modèle murin <i>Sgo1</i> <sup>+/LacZ</sup> . ....	69
Figure 35. Grossissement du marquage à la DAB du ventricule gauche avec la chambre face au côté gauche (A-D) et de l'épithélium du tube intestinal (E-H). ....	70
Figure 36. Voie de signalisation TGF- $\beta$ . ....	71
Figure 37. Modèle du rôle de BUB1 dans la signalisation TGF- $\beta$ . ....	75

### Chapitre 3

Figure 1. Components (SMC1, SMC3, RAD21, and STAG1/2) and partners of the cohesin complex. ....	116
Figure 2. Functions of the cohesin complex in cohesion and in non-cohesion-related mechanisms. ....	116

<b>Figure 3. Representations of SGO1.</b> .....	117
<b>Figure 4. Comparison of the canonical and noncanonical findings of SGO1 K23E mutation with SGO1 haploinsufficiency in mice and other cohesinopathies to highlight the differences between each condition.</b> .....	118

#### **Chapitre 4**

<b>Figure 1. Transcriptomic profiling of CAID patient dermal fibroblasts.</b> .....	165
<b>Figure 2. Candidates validation and expression profile of cohesinopathies genes.</b> .....	166
<b>Figure 3. Proteomic profiling of CAID patient dermal fibroblasts.</b> .....	168
<b>Figure 4. Gastrointestinal histology of CAID patients.</b> .....	169
<b>Figure 5. Gastrointestinal fluorescent histology of CAID patients.</b> .....	171
<b>Figure 6. Electrophysiology of CAID patient dermal fibroblasts and analysis response of the canonical and non-canonical TGF-<math>\beta</math> pathways.</b> .....	173
<b>Figure 7: Epigenetic profile of CAID patients.</b> .....	175

#### **Chapitre 5**

<b>Figure 38. Mécanisme proposé des effets de la mutation SGO1 K23E dans le syndrome CAID.</b> .....	192
--	-----

#### **Annexe 1**

<b>Figure 1. Analyse par microscopie confocale du patron d'expression de SGO1 pendant la mitose dans les fibroblastes de peau des patients CAID.</b> .....	i
--	---

#### **Annexe 2**

<b>Figure 1. Phénotypes cellulaires du syndrome CAID.</b> .....	ii
---	----

#### **Annexe 4**

<b>Figure 1. Corrélations entre les analyses de méthylation de l'ADN et les analyses de transcriptomique à passage précoce (p8) (A) et à passage tardif (p14) (B).</b> .....	ix
--	----

<b>Figure 2. Corrélations entre les analyses de compaction de la chromatine et les analyses de transcriptomique à passage précoce (p8) (A) et à passage tardif (p14) (B).</b> .....	x
---	---

#### **Annexe 5**

<b>Figure 1. Western blots des marques d'histones.</b> .....	xii
<b>Figure 2. Quantification densitométrique des Western blots des marques d'histones.</b> ....	xiii

## Liste des abréviations

$\alpha$ SMA:  $\alpha$  Smooth Muscle Actin  
ACTG2: Actin, Gamma 2, Smooth Muscle, Enteric  
ADD2: Adducin 2  
ADN: Acide Désoxyribonucléique  
AFF4: ALL1-Fused Family Member 4  
APC: Anaphase Promoting Complex  
ARN: Acide Ribonucléique  
ALPHA: Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assays  
ANKRD11: Ankyrin Repeat Domain 11  
ATAC: Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput  
ATRX: Syndrome d'alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X  
ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked  
BAF: BRG1-Associated Factor  
BARX1: BarH-Like Homeobox 1  
BIRC5: Baculoviral IAP Repeat Containing 5  
BMP: Bone Morphogenetic Protein  
BMPR2: Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2  
BRD4: Bromodomain Containing 4  
BRY: Brachyury  
BUB1: Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 Homolog  
CAID: Chronic Atrial and intestinal dysrhythmia  
CACNA1C: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C  
CACNA2D2: Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 2  
CALD1: Caldesmon  
CAMK1G: Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IG  
CBP: CREB-binding protein  
CCNE: Cellules de la crête neurale entérique  
CD3: Cluster of Differentiation 3  
CdLS: Syndrome de Cornelia de Lange

CDK1: Cyclin Dependent Kinase 1  
 CDX2: Caudal Type Homeobox 2  
 CENP-F: Centromere Protein F  
 CHD7: Chromodomain helicase DNA-binding 7  
 CHOPS: cognitive impairment, coarse facies, heart defects, obesity, pulmonary involvement, short stature, and skeletal dysplasia  
 CIA: Communication Interauriculaire  
 CICs: Cellules Interstitielles de Cajal  
 CICs-MY: CICs myentériques  
 CICs-IM: CICs intramusculaires  
 CICs-SEP: CICs septales  
 CIV: Communication Interventriculaire  
 c-KIT: Tyrosine-Protein Kinase Kit  
 CNVs: Copy Number variants  
 CPC: Chromosomal Passenger Complex  
 CSD: Chromo Shadow Domain  
 CTCF: CCCTC-Binding Factor  
 Cx30/30.2/40/43/45: Connexin  
 DAB: 3,3'-Diaminobenzidine  
 DDX11: DEAD/H-Box Helicase 11  
 DNMT1/3A/3B: DNA methyltransferases 1/3A/3B  
 ECG: Électrocardiogramme  
 EDNRB: Endothelin Receptor Type B  
 ELAVL: Embryonic Lethal, Abnormal Vision, Drosophila, Homolog-Like 1  
 endoMT: Transition Endothélio-Mésenchymateuse  
 EOMES: Esmodermin  
 ERK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
 ESCO2: Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2  
 EZH1/2: Enhancer of Zeste 1/2 Polycomb Repressive Complex Subunit  
 FABP7: Brain-Type Fatty Acid-Binding Protein 7  
 FAIM2: Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2

FBN1: Fibrillin-1  
 FBS: Fetal Bovine Serum  
 FGF: Fibroblast Growth Factor  
 FHF: First heart field ou primary heart field  
 FLK-1: Fetal Liver Kinase 1  
 FLNA: Filamin A  
 GATA4/6: GATA Binding Protein 4/6  
 GDNF: Glial Cell Derived Neurotrophic Factor  
 GDP: Guanosine diphosphate  
 GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein  
 GO: Gene Ontology  
 GPR37: G Protein-Coupled Receptor 37  
 GTP: Guanosine triphosphate  
 HAT: Histone Acetyltransferase  
 HBA2: Hemoglobin Subunit Alpha 2  
 HBB: Hemoglobin Subunit Beta  
 HCN1/2/4: Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 1/2/4  
 HDAC: Histone deacetylases  
 HLA-DMA: Major Histocompatibility Complex, Class II, DM Alpha  
 HMT: histone methyltransferase  
 HNK-1: Human Natural Killer-1  
 HOX: Homeobox  
 HP1: Heterochromatin Protein 1  
 HOPX: Homeodomain-only protein  
 HRP: Horseradish peroxidase  
 HSP70: Heat Shock Protein 70  
 $I_{CA}$ : Courant  $Ca^{2+}$   
 $I_F$ : Courant stimulateur  
 $I_K$ : Courant  $K^+$   
 $IK_1$  : Courant Potassique rectifiant entrant

$I_{Na}$ : Courant  $Na^+$   
 INCENP: Inner Centromere Protein  
 INPP5F: Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F  
 ISL1: Islet-1  
 $I_{to}$  : Courant potassique transitoire sortant  
 JNK: C-Jun N-Terminal Kinase  
 KCND2/3: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 2/3  
 KCNE: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E  
 KCNH2: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2  
 KCNJ/2/5/8/11: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member  
 KCNQ1: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1  
 KLF4: Kruppel-like factor 4  
 KDM6A: Lysine Demethylase 6A  
 KMT2D: Histone-lysine N-methyltransferase 2D  
 LDS: Loeys-Dietz Syndrome  
 LTBP: Latent transforming growth factor beta-binding proteins  
 MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
 MASH1: Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1  
 MAU: MAU Sister Chromatid Cohesion Factor  
 MECP2: Methyl-CpG Binding Protein 2  
 MEF2C: Myocyte Enhancer Factor 2C  
 MEK: MAPK kinase Extracellular signal regulated Kinase  
 MESP1: Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1  
 MLK3: Mixed-lineage kinase 3  
 MMR: Miss-match Repair  
 MNS: Maladie du nœud sinusal  
 MSX1: Msh Homeobox 1  
 MYBPH: Myosin Binding Protein H  
 MYH6/11: Myosin Heavy Chain 6/11  
 MYL4/7: Myosin Light Chain 4/7  
 NCX1: Sodium/Calcium Exchanger 1



NEK2A: NIMA Related Kinase 2  
NFAT: Nuclear factor of activated T-cells  
NIPBL: Nipped-B-Like Protein Cohesin Loading Factor  
NKX2.5: NK2 Homeobox 5  
NLS: Nuclear Localization Signal  
NPPA: Natriuretic Peptide A  
NSD2: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2  
OCT4: Octamer-Binding Protein 4  
p: Nombre de passage  
p38: p38 MAP Kinase  
p75: Nerve Growth Factor Receptor  
p300: p300 histone acetyltransferase  
PDA: Patent Ductus Arteriosus  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PCGF2: Polycomb Group Ring Finger 2  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PKD: Polycystin  
PDS5: Androgen-Induced Proliferation Inhibitor  
PDX1: Pancreatic and Duodenal Homeobox 1  
PGP9.5: Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1  
PHOX2B: Paired Like Homeobox 2b  
PITX2: Paired Like Homeodomain 2  
PLK1: Polo Like Kinase 1  
POIC: Pseudo-obstruction intestinale chronique  
POLG1: DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit  
PSMB8: Proteasome Subunit Beta 8  
PPP1R11: Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 11  
PP2A: Protein Phosphatase 2  
P/S: Pénicilline/Streptomycine  
RAD21: Sister Chromatid Cohesion 1  
Raf: Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

RBS: Syndrome de Roberts  
 REC8: Recombination And Sister Chromatid Cohesion Protein Homolog  
 RET: Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor  
 RMP: Resting Membrane Potential  
 RNAseq: Séquençage de l'ARN  
 RRBS: Reduced Representative Bisulfite Sequencing  
 RYR2: Ryanodine Receptor 2  
 S100B: S100 Calcium Binding Protein B  
 SAC: Spindle Assembly Checkpoint  
 SARA: Smad anchor for receptor activation  
 SBE: SMAD Binding Element  
 SCO2: Synthesis Of Cytochrome C Oxidase 2  
 SCN5A: Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5  
 SCV: Système de conduction ventriculaire  
 SET: Protein Phosphatase Type 2A Inhibitor  
 SFRP1/2: Secreted Frizzled Related Protein 1/2  
 SGO1/2: Shugoshin-1/2  
 SHH: Sonic Hedgehog  
 SHC: SH2 Domain Protein C1  
 SHF: Secondary Heart Field  
 SHOX2: Short Stature Homeobox 2  
 SILAC: Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture  
 SKI: V-Ski Avian Sarcoma Viral Oncogene Homolog  
 SMAD2/3: Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2/3  
 SMARCD3: SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily D, Member 3  
 SMC1/3: Structural Maintenance of Chromosomes 1/3  
 SMYD1: SET and MYND Domain Containing 1  
 SNE: Système nerveux entérique  
 SOS: Son Of Sevenless Homolog 1  
 SOX2/9/10: SRY-Box 2/9/10

SRF: Serum Response Factor  
TADs: Topology Associated Domains  
TAGLN: Transgelin  
TAK1: TGF-Beta-Activated Kinase 1  
TBX1/3/5/18: T-Box Transcription Factor  
TDRD9: Tudor Domain Containing 9  
TET1: Tet Methylcytosine Dioxygenase 1  
TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$   
TGFR: Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor  
TNNT1: Troponin I, Slow Skeletal Type  
TNNT3: Troponin I, Cardiac Type  
TOF: Tétralogie de Fallot  
TPM1/2/4: Tropomyosin 1/2/4  
TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6  
TUBB1: Neuron-specific  $\beta$ III tubulin  
UCSC: University of California Santa Cruz  
UHRF1: Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1  
WABS: Syndrome Warsaw Breakage  
Wnt: Wingless-Type  
WT1: Wilms Tumor Protein  
ZNRD1: Zinc Ribbon Domain Containing 1

*À tous ceux qui m'ont accompagnée et soutenue au cours de ce grand projet.*

*La science est une histoire sans fin. La question n'est pas de savoir qui a raison, qui a tort. Le but est de progresser. [...]*

*Les plus grands défis ne sont pas surmontés quand nos prédictions sont exactes, mais quand elles ne le sont pas ! Nous découvrons alors de nouvelles informations qui nous obligent à modifier tout ce que nous croyions savoir. -Stephen Hawking*

*« Ce qui ne nous tue pas nous rend plus fort » -Friedrich Nietzsche*

## Remerciements

Je remercie en premier lieu le Dr Andelfinger pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir encadrée et soutenue dans les bons, mais surtout dans les mauvais moments. Il n'a jamais douté de ma capacité à surmonter les obstacles qui font le lot quotidien de la vie d'étudiant au doctorat bien que j'en aie douté moi-même à maintes reprises. Il m'a également permis de développer mon autonomie, mon indépendance intellectuelle et d'élargir mes horizons par le biais de collaborations internationales.

J'aimerais également remercier toute l'équipe du laboratoire du Dr Andelfinger et du Centre de recherche du CHU Sainte-Justine. J'y ai rencontré des personnes formidables avec lesquelles j'ai passé de bons moments, autant du point de vue scientifique que personnel. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Natacha Gosset qui a commencé ses études au laboratoire en même temps que moi et qui est vite devenue une complice de tous les jours et une amie très chère sans qui mon doctorat aurait été bien terne.

Finalement, je remercie infiniment mes parents et amis qui m'ont supportée et encouragée tout au long de ce périple ainsi que mon conjoint, Félix Grenier-Mérineau, qui a toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles et sans qui je ne serai certainement pas passée au travers.

# Chapitre 1 : Introduction

Tout au long de la vie, deux organes doivent se contracter de façon rythmique, soit le cœur et les intestins. Chacun de ses organes possède des cellules contractiles spécialisées qui peuvent générer un potentiel d'action spontanée via un mécanisme de polarisation commun qui implique l'utilisation de canaux ioniques. Dans le cœur, le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite, est responsable de ce mécanisme alors que dans les intestins, le réseau des cellules interstitielles de Cajal, situé dans la paroi intestinale, et le système nerveux entérique autonome dépolarisent les myocytes et permettent l'induction des signaux électriques.

Notre groupe a récemment identifié le premier syndrome humain d'arythmie généralisée englobant à la fois les dysrythmies cardiaques et gastro-intestinales. Nous avons nommé ce syndrome «Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia» (CAID) (OMIM 616201). À ce jour, nous avons identifié 22 patients canadiens-français, 2 patients colombiens, et un patient suédois présentant une combinaison de deux phénotypes distincts, la maladie du nœud sinusal et la pseudo-obstruction intestinale chronique. Nous avons identifié une mutation ponctuelle homozygote fondatrice dans un constituant du complexe de la cohésine, *SGO1* (Shugoshin-1), comme étant la cause du syndrome CAID (1). Cette mutation modifie radicalement un acide aminé hautement conservé, soit une lysine qui est remplacée par un acide glutamique (K23E).

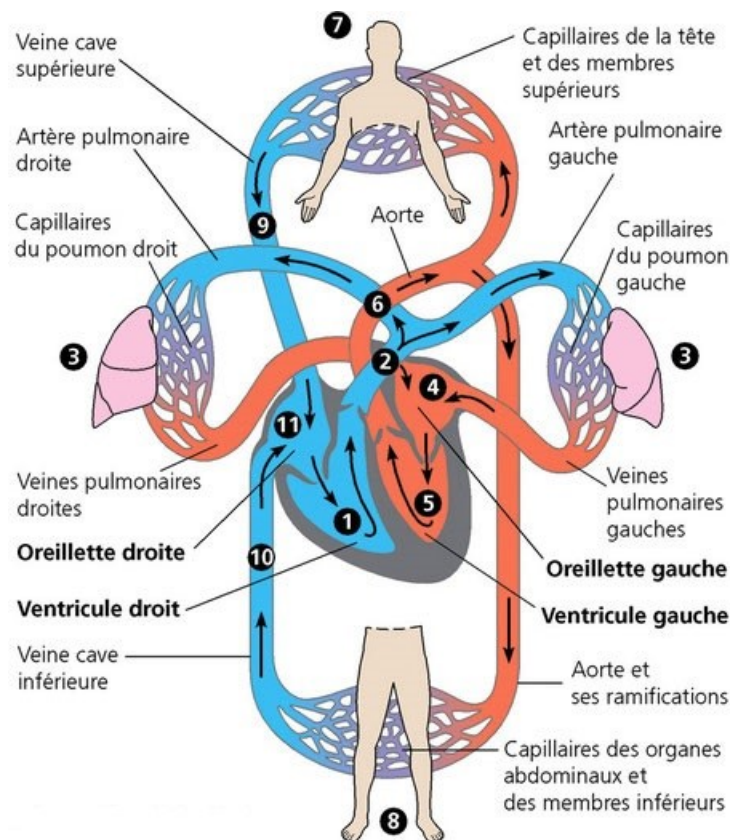
Les caryotypes des patients CAID présentent un défaut de cohésion centromérique évident, plaçant le syndrome CAID dans la famille des cohésinopathies. Bien qu'il y ait un chevauchement des manifestations cliniques entre le syndrome CAID et les autres cohésinopathies, ce dernier se distingue par l'absence de retard intellectuel et de croissance. De plus, les patients CAID ne présentent aucun phénotype clinique directement lié aux rôles canoniques de SGO1 dans la cohésion centromérique et la ségrégation des chromatides sœurs, comme le cancer ou le vieillissement prématuré. De plus, les fibroblastes dermiques des patients CAID ont montré une délocalisation cytosolique du patron d'expression de SGO1, une accélération du cycle cellulaire, un plus haut taux de sénescence et une plus grande activation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (1). Il s'agit de la première identification clinique d'un lien entre la cascade TGF- $\beta$  et le complexe de la cohésine. Ces observations soulèvent des questions pathophysiologiques essentielles quant au rôle de SGO1

dans ces processus et suggèrent l'existence d'un nouveau rôle non canonique de SGO1 dans la pathophysiologie du syndrome CAID. Puisque l'étiologie du syndrome CAID est inconnue à ce jour, une approche systématique des différents mécanismes impliqués dans le développement, le contrôle génétique, la régulation et les fonctions du cœur et de l'intestin, les deux organes principaux affectés par ce syndrome, sera faite afin de mieux comprendre les possibles mécanismes sous-jacents. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous travaillerons sur le seul modèle CAID disponible, à savoir les fibroblastes de peau de patients CAID, puisqu'aucun modèle de souris n'est viable.

## 1.1 – Système circulatoire

### 1.1.1 – Structure et rôles du système circulatoire

Le système circulatoire, aussi appelé appareil cardiovasculaire, est constitué de trois composantes, soit le cœur, les vaisseaux sanguins et le sang. Le rôle principal de ce système repose sur l'acheminement des gaz, comme l'oxygène ( $O_2$ ) et le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) (Figure 1), et d'autres molécules nécessaires à la nutrition, la croissance et la réparation dans toutes les cellules du corps (2). Le système circulatoire est également impliqué dans la signalisation cellulaire, par l'intermédiaire des hormones et des neurotransmetteurs circulant dans le sang, dans la médiation de l'inflammation et dans la régulation de la réponse immunitaire (2).



**Figure 1. Circulation sanguine chez l'humain.** Le sang riche en  $O_2$  est présenté en rouge et le sang pauvre en  $O_2$  en bleu. La circulation sanguine débute dans le ventricule droit, où le sang est pompé dans les poumons par le tronc pulmonaire qui se divise pour former les artères pulmonaires droite et gauche (Figure 2). Au fur et à mesure que le sang s'écoule dans les



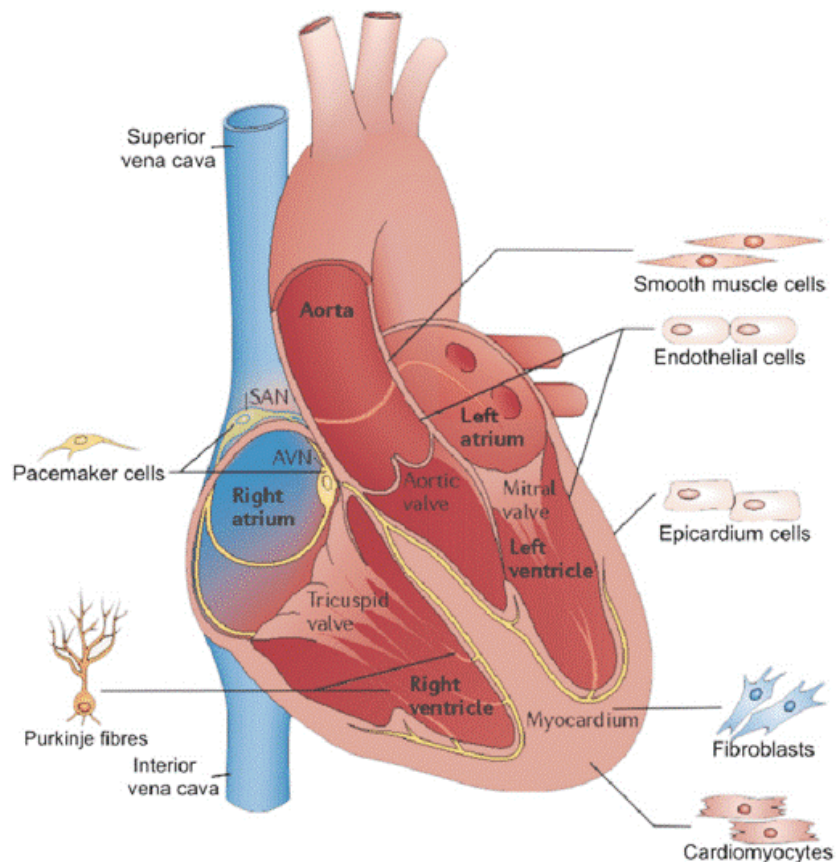
capillaires pulmonaires, il capture de l'O<sub>2</sub> et libère du CO<sub>2</sub>. Le sang enrichi en O<sub>2</sub> revient au cœur grâce aux veines pulmonaires droite et gauche qui se déversent dans l'oreillette gauche pour ensuite s'écouler dans le ventricule gauche. Ce dernier expulse le sang riche en O<sub>2</sub> dans l'aorte qui assure le transport vers les artères parcourant le corps. Au fur et à mesure que le sang entre dans les capillaires des différents tissus, l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> diffusent selon leur gradient de concentration (l'O<sub>2</sub> diffuse vers les cellules et le CO<sub>2</sub> vers le sang). Les capillaires se rejoignent par la suite pour former les veinules qui transportent le sang aux veines. Le sang pauvre en O<sub>2</sub> retourne à l'oreillette droite du cœur par l'intermédiaire des veines caves supérieure et inférieure pour ensuite se déverser dans le ventricule droit, et le cycle recommence (3).

### **1.1.2 – Structure du cœur**

L'organe central du système circulatoire humain, le cœur, est constitué de 4 chambres, soit deux oreillettes et deux ventricules, ainsi que de plusieurs vaisseaux sanguins, soit l'aorte, la veine cave, les artères pulmonaires et les veines pulmonaires (Figure 2) (4). Les oreillettes sont pourvues d'une paroi mince et servent de réservoir pour le sang qui retourne au cœur alors que les ventricules possèdent une paroi beaucoup plus épaisse permettant la production de contractions plus puissantes afin d'acheminer le sang dans les différents organes du corps (3). Les oreillettes et les ventricules sont séparés par des valves (côté gauche : valve mitrale, côté droit : valve tricuspide). Le cœur possède également une valve qui sépare le ventricule gauche de l'aorte (valve aortique), et une valve qui sépare le ventricule droit de l'artère pulmonaire (valve pulmonaire). Ensuite, le côté gauche et le côté droit du cœur sont séparés par le septum qui est divisé en 2 parties, le septum interauriculaire et le septum interventriculaire. Le cœur possède également un système de conduction nécessaire à la transmission de l'influx nerveux. Ce dernier est constitué principalement du nœud sinusal et du nœud atrioventriculaire ainsi que d'autres structures qui seront décrites en détails dans la section 1.2.

La structure interne du cœur est constituée de 3 couches distinctes : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. L'endocarde est constitué d'une membrane de cellules épithéliales qui tapissent la face interne du cœur. Le principal rôle de l'endocarde est de relier le cœur aux vaisseaux sanguins, mais ce dernier possède plusieurs autres fonctions essentielles au développement cardiaque. L'endocarde joue un rôle important dans la signalisation aux cardiomyocytes, la transdifférenciation des myocytes en fibres de Purkinje, la trabéculatation du myocarde ainsi que dans la transition endothéliale-mésenchymateuse (endoMT) des cellules provenant de régions spécifiques de l'endocarde pour former les coussins endocardiques (5-9).

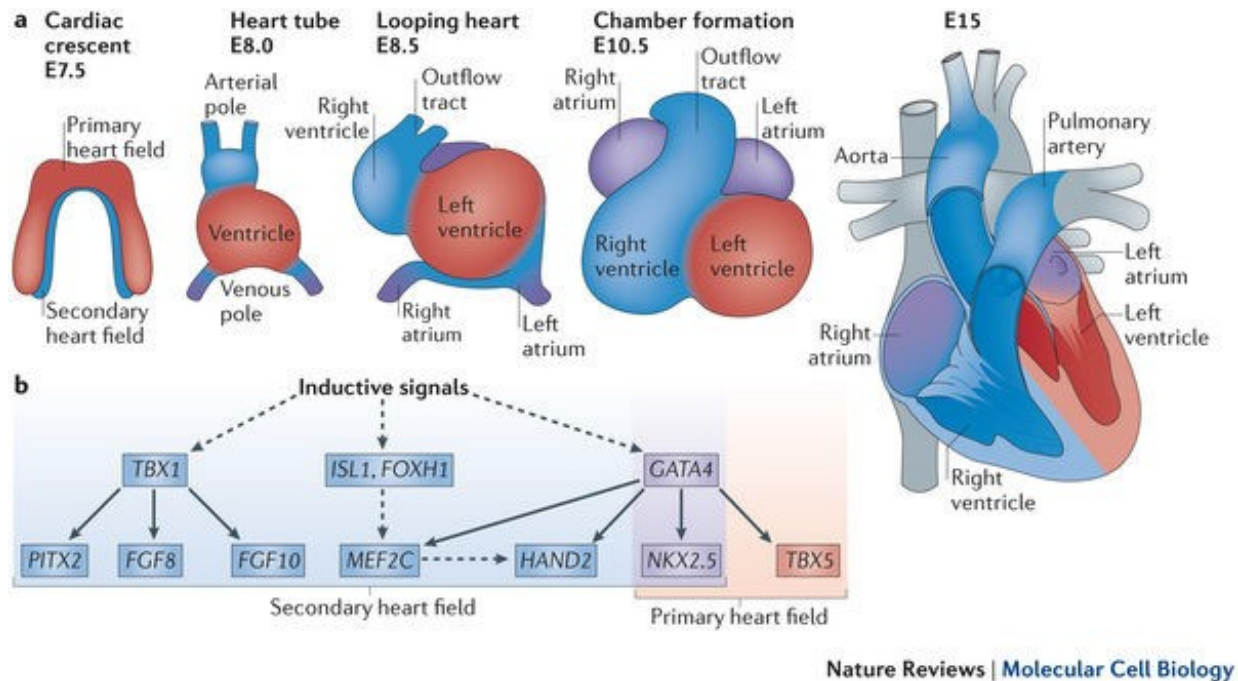
Le myocarde, quant à lui, est constitué de cellules musculaires striées spécialisées, les cardiomyocytes, et constitue le muscle principal du cœur. Il joue un rôle primordial dans la circulation sanguine grâce à ses contractions rythmiques et spontanées qui permettent la propulsion du sang à travers l'organisme (10). Finalement, le péricarde est un sac à double paroi rempli de liquide qui enrobe le cœur. Ils possèdent plusieurs fonctions : Le maintien de la position du cœur dans la cavité thoracique, la séparation du cœur des autres tissus contenus dans la cage thoracique, la protection contre la dilatation ventriculaire, le maintien d'une faible pression transmurale (pression générée par une cavité cardiaque), la facilitation de l'interdépendance ventriculaire et du remplissage auriculaire (11). Les différentes structures du cœur sont composées de types cellulaires distincts ayant des fonctions spécifiques (Figure 2) (4). Toutefois, avant de donner naissance à toutes ces cellules et structures, le cœur doit d'abord se développer au cours de l'embryogenèse selon un processus nommé cardiogenèse.



**Figure 2. Représentation schématique de la structure et des différents composants du cœur humain ainsi que les types cellulaires les constituants. (Adapté de (4)).**

### 1.1.3 –Cardiogenèse

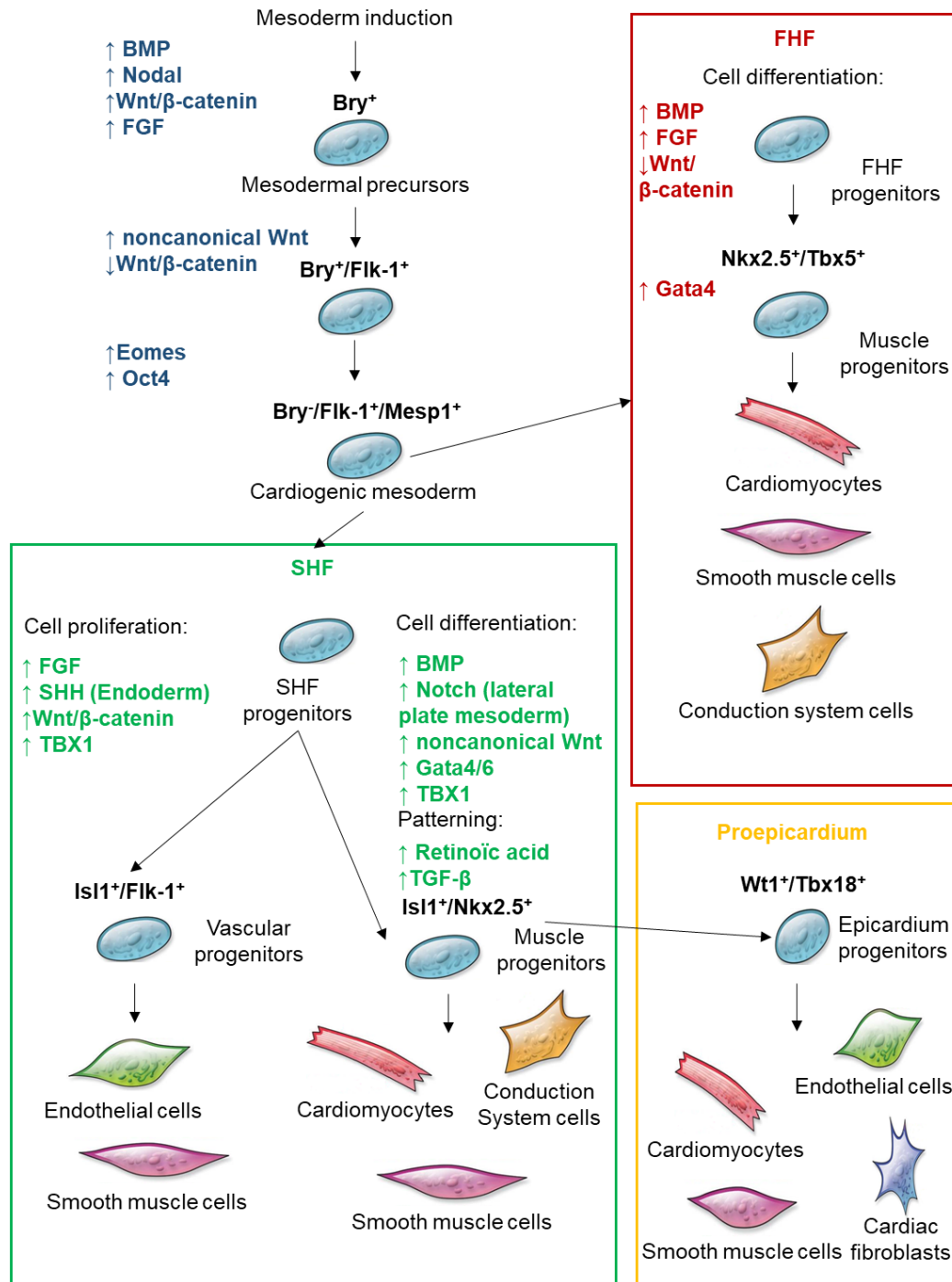
Le cœur est le premier organe à se développer au cours de l'embryogenèse (Figure 3) (4). L'étude de la cardiogenèse chez la souris a montré que le cœur se forme à partir de deux lignées cardiaques progénitrices, soit le champ cardiaque primaire et le champ cardiaque secondaire. Au jour embryonnaire E6.5, les cellules progénitrices mésodermiques entrent dans la ligne primitive et migrent dans une direction antérolatérale pour former deux groupes de cellules de chaque côté de la ligne médiane. La première population de cellules migre vers la future région de formation du cœur pour former le champ cardiaque primaire. Ce dernier s'étend ensuite à travers la ligne médiane pour donner naissance au croissant cardiaque dans la partie antérieure du mésoderme à E7.5. Le second champ cardiaque se développe à partir du mésoderme pharyngé localisé dans les régions médiane et antérieure du croissant cardiaque. À E8.0, les cellules du croissant cardiaque migrent vers la ligne médiane et forment le tube linéaire cardiaque. Les cellules du second champ cardiaque permettent ensuite l'allongement du tube linéaire cardiaque, générant ainsi les pôles artériel et veineux. Le tube linéaire cardiaque forme alors une boucle vers la droite qui conduira à la formation des ventricules et des oreillettes à E8.5, causant ainsi la migration du pôle veineux vers la région antérieure afin d'assurer le développement et le bon positionnement des futures chambres cardiaques. Il y a ensuite formation du septum et des valves afin de séparer les différentes chambres jusqu'à E15. Le champ cardiaque primaire contribue au ventricule gauche ainsi qu'à une partie de l'oreillette gauche alors que le champ cardiaque secondaire contribue au ventricule droit, aux oreillettes gauche et droite et la voie de sortie du cœur (4, 12-14).



**Figure 3. Développement et régulation de la cardiogenèse.** Rouge : Gènes exprimés dans le champ cardiaque primaire. À E7.5, il y a formation du croissant cardiaque. Il s'ensuit la formation du tube cardiaque à E8.0. À E8.5, il y a formation de la boucle cardiaque suivie de la formation des chambres à E10.5. Bleu : Gènes exprimés dans le champ cardiaque secondaire. Mauve : Gènes exprimés dans les deux champs cardiaques.(4).

### 1.1.4 - Voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle de la cardiogenèse

L'expression de gènes spécifiques et les mouvements cellulaires nécessaires à la cardiogenèse sont régulés temporellement et spatialement par des voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle bien établies (Figure 4) (15). Il faut toutefois noter qu'un grand nombre de voies et d'interactions entre elles sont impliquées, rendant impossible une description exhaustive de chacune d'elles individuellement.



**Figure 4. Voies de signalisation impliquées dans la spécification des cellules progénitrices cardiaques.** Lors de l'induction du mésoderme, les précurseurs cardiaques expriment Bry. Cette expression s'éteint graduellement et est remplacée par l'expression de Mesp1 (Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1) au stade du mésoderme précardiaque. Dans le champ cardiaque primaire (FHF), plusieurs voies de signalisation induisent chez ces précurseurs l'expression de Nkx2.5<sup>+</sup> (NK2 Homeobox 5)/Tbx5<sup>+</sup> (T-Box Transcription Factor 5) afin de donner naissance aux cardiomyocytes, aux cellules

musculaires lisses et aux cellules du système de conduction. Au niveau du champ cardiaque secondaire (SHF), l'induction de l'expression d'Is11 (Islet-1) et de Flk-1 (Fetal Liver Kinase 1) chez ces précurseurs donne naissance aux progéniteurs vasculaires qui se différencient en cellules endothéliales et des muscles lisses. Une deuxième population de précurseurs exprimant Is11 et Nkx2.5 donne, quant à elle, naissance aux précurseurs des muscles qui se différencient en cardiomyocytes, en cellules du système de conduction et en cellules musculaires lisses et aux précurseurs de l'épicaire qui se différencient en cardiomyocytes, en cellules endothéliales et musculaires lisses ainsi qu'en fibroblastes cardiaques. (Adapté de (15, 16)).

L'induction du mésoderme nécessaire au développement cardiaque à E5.5 est régulée par de nombreuses voies de signalisation qui interagissent entre elles, soit les voies Nodale, BMP (Bone Morphogenetic Protein), Wnt (Wingless-Type) et FGF (Fibroblast growth factor) (17, 18). À E6.5, lorsque les cellules progénitrices mésodermiques entrent dans la ligne primitive, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine induit l'expression du facteur de transcription à boîte T Bry (Brachyury) (19). Il y a ensuite inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et activation de la voie Wnt non canonique ce qui induit les précurseurs Bry<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> (20, 21). Ces progéniteurs perdent leur expression de Bry et expriment le facteur de transcription Eomes (Esmodermine) (22, 23). L'expression d'Eomes dans la ligne primitive marque les précurseurs mésodermiques les plus précoces et favorise la formation de progéniteurs cardiovasculaires en activant, avec l'aide d'Oct4 (Octamer-Binding Protein 4), le facteur de transcription Mesp1 (23). Les précurseurs chez lesquels Mesp1 est activé s'éloignent de la ligne primitive et se différencient en progéniteurs qui viennent peupler le champ cardiaque primaire et le champ cardiaque secondaire après avoir subi certaines restrictions de différenciation et donneront naissance aux précurseurs cardiaques du tube cardiaque, de l'endoderme et de l'épicaire (24, 25).

Au niveau du champ cardiaque primaire, à E7.5, l'activation des voies BMP et FGF ainsi que l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit la différenciation des précurseurs. À E8.5, l'expression de Nkx2.5, Gata4 (GATA Binding Protein 4) et Tbx5 chez ces derniers induit la différenciation en cardiomyocytes, en cellules des muscles lisses et en cellules du système de conduction qui seront essentiels pour la croissance et la différenciation des segments postérieurs du cœur et des précurseurs des oreillettes et des ventricules (16, 18, 26-36).

Au niveau du champ cardiaque secondaire, à E7.5, les voies de signalisation FGF, Wnt/ $\beta$ -caténine et les signaux Shh (Sonic Hedgehog) en provenance de l'endoderme favorisent la prolifération des cellules progénitrices (37, 38). En effet, les signaux Shh et les signaux canoniques Wnt/ $\beta$ -caténine sont importants pour le maintien de la prolifération et l'inhibition de la différenciation (38). Au contraire, les protéines BMP sécrétées par le mésoderme des plaques latérales, ainsi que les signaux Notch, Wnt non canonique et l'expression des facteurs de transcription Gata4/6, favorisent la différenciation cardiaque des progéniteurs du champ cardiaque secondaire (39, 40). Tbx1 (T-Box Transcription Factor 1) régule également la prolifération et la différenciation des précurseurs dans le champ cardiaque secondaire (41). Finalement, la structuration du deuxième champ cardiaque est régie par les signaux de l'acide rétinoïde et TGF- $\beta$ . L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit l'expression du facteur de transcription Isl1, dont la fonction est essentielle à la survie, la prolifération et la migration des progéniteurs du champ cardiaque secondaire dans le tube cardiaque primitif (42, 43). À E8.5, il existe deux sous populations de progéniteurs du champ cardiaque secondaire (21, 44-46). La première se caractérise par l'expression d'Isl1 et de Flk-1 et se différencie en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses (16, 44). La seconde est caractérisée par l'expression d'Isl1 et de Nkx2.5 et donne naissance aux cellules musculaires lisses et aux cardiomyocytes tout en contribuant aux lignées proépicardiales, qui se caractérisent par l'expression de Wt1 (Wilms Tumor Protein) et de Tbx18 (T-Box Transcription Factor 18) et qui formeront plus tard des fibroblastes cardiaques, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (47-49). L'expression d'Isl1 s'éteint lorsque les cellules progénitrices atteignent le cœur en développement et se différencient (50). Pour ce faire, Notch1 régule négativement l'accumulation de  $\beta$ -caténine libre dans les progéniteurs cardiaques, ce qui inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, et subséquemment, l'expression d'Isl1.

### **1.1.5 - Régulation épigénétique de la cardiogenèse**

La régulation transcriptionnelle de la cardiogenèse décrite à la section 1.1.4 dépend elle-même de la régulation épigénétique qui contrôle l'accessibilité à la chromatine.

L'étude du méthylome de cardiomyocytes néonataux, adultes et d'adultes souffrant de déficience cardiaque a permis d'identifier plusieurs processus épigénétiques requis pour le

développement et la maturation des cardiomyocytes (51). En effet, de grandes régions génomiques sont méthylées de manière différentielle au cours du développement et de la maturation de ces derniers (51). C'est le cas, entre autres, des corps géniques des cardiomyocytes où une déméthylation et une expression génique accrue ont été observées (51). Le développement des cardiomyocytes est également accompagné d'une interaction dynamique entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones (52). Au cours du développement des myocytes cardiaques, les CpG méthylés au niveau des amplificateurs et des régions géniques ainsi que les marques d'histone canoniques coopèrent pour induire l'expression des gènes *MYH6* (Myosin Heavy Chain 6), *RYR2* (Ryanodine Receptor 2) et *TNNI3* (Troponin I3, Cardiac Type) ou la répression des gènes *MYL4* (Myosin Light Chain 4), *NPPA* (Natriuretic Peptide A), et *TNNI1* (Troponin I1, Slow Skeletal Type) pour façonner le transcriptome des cardiomyocytes au cours du développement et de la maturation (52). Après la naissance, la méthylation de novo de l'ADN par DNMT3A (DNA methyltransferases 3A) et DNMT3B (DNA methyltransferases 3B) provoque la répression des gènes cardiaques fœtaux, y compris des composants essentiels du sarcomère cardiaque (51).

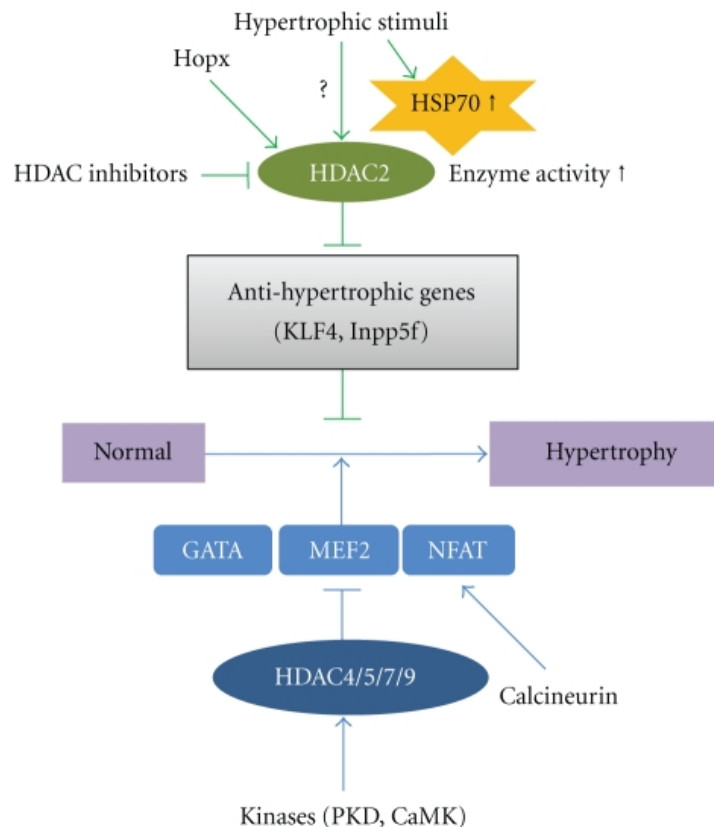
D'autres facteurs sont également impliqués dans la régulation épigénétique du développement cardiaque. Le complexe BAF (BRG1-Associated Factor), un facteur de remodelage de la chromatine, est essentiel à la prolifération des cardiomyocytes et au développement adéquat du cœur (53). SMARCB1 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1) aussi connu sous le nom de BAF60c, un composant du complexe BAF, est également requis pour l'expression de *GATA4*, *NKX2.5* et *TBX5* (54). PCGF2 (Polycomb Group Ring Finger 2), qui régule le complexe répressif polycomb, permet l'expression de nombreux gènes mésodermiques et cardiaques, notamment *Brachyury*, *Mesp1*, *Gata4*, *Gata6*, *Tbx5* et *Nkx2.5* dans des cellules ES qui se différencient en cardiomyocytes (55). De nombreuses HDACs (histones désacétylases) sont également impliquées dans le développement cardiaque. HDAC2 inhibe la prolifération des cardiomyocytes (56). HDAC5 et HDAC9 sont nécessaires à la régulation des programmes d'expression géniques requis pour la différenciation, la prolifération et la morphogenèse des myocytes qui sous-tendent la formation du cœur (56).



### **1.1.6 - Dérégulation épigénétique impliquées dans les maladies cardiaques**

Au cours des dernières années, la régulation épigénétique est apparue comme un nouveau pathomécanisme dans plusieurs maladies humaines, incluant des maladies cardiaques.

Plusieurs études ont montré que l'activité des HATs (histones acetyltransferases) et les HDACs jouent un rôle dans la réponse à l'hypertrophie cardiaque et la fibrose (57-60). Il a été démontré que la surexpression des HATs p300 (p300 histone acetyltransferase) et CBP (CREB-binding protein) dans les cardiomyocytes de rat peut induire l'hypertrophie et que cette induction dépend de leur activité acétyltransférase (59). L'expression transgénique de p300 dans le cœur chez la souris adulte entraîne également l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (61). De plus, p300 sert également d'adaptateur pour des facteurs de transcription sensibles aux stimuli hypertrophiques, soit GATA4, SRF (Serum Response Factor) et MEF2 (60, 62, 63). Ces interactions sont essentielles au bon fonctionnement de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription (60, 62, 63). Au niveau des HDACs, des effets opposés ont été observés en fonction de la classe des HDACs. Il a été démontré que les HDACs de classe II répriment la croissance des myocytes alors que les HDACs de classe I pourraient exercer des effets opposés et favoriser la croissance cellulaire, conduisant à l'hypertrophie cardiaque et à la fibrose (Figure 5) (58, 64-67).



**Figure 5. Cascades de signalisation impliquant les HDACs de classe I et II dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.** Les HDACs de classe I peuvent être régulées par la voie Hopx (Homeodomain-only protein)/HDAC2/HSP70 (Heat Shock Protein 70)/KLF4 (Kruppel-like factor 4). Chez les souris transgéniques pour Hopx, l'hypertrophie cardiaque et la fibrose sont induites par le recrutement de HDAC2. Le stress hypertrophique induit l'expression de la protéine de choc thermique HSP70 qui vient ensuite activer HDAC2. L'activation de HDAC2 cause l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et induit l'hypertrophie. L'augmentation de l'activité HDAC2 diminue aussi l'expression des médiateurs anti-hypertrophiques KLF4 et Inpp5f (Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F). Les HDACs de classe II, quant à eux, peuvent réprimer l'hypertrophie cardiaque par interaction directe ou indirecte avec MEF2. Les HDACs de classe II HDAC4/5/7/9 peuvent être activés par PKD (Polycystin) ou CaMK. Ils agissent ensuite comme des régulateurs négatifs de l'hypertrophie cardiaque en réprimant l'expression génique médiée par MEF2/GATA4/NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (67).

Des études du statut de méthylation ont également été menées sur des cœurs fœtaux provenant de patients atteints de maladie du cœur congénitale syndromique versus non syndromique dans le contexte du syndrome de Down (68). En effet, une malformation cardiaque est retrouvée chez environ 50% des individus atteints de ce syndrome (68). Une

hyperméthylation de plusieurs sites intragéniques dans le gène *MSX1* (Msh Homeobox 1), impliqué dans la morphogénèse du tube de sortie cardiaque, a été identifiée chez un fœtus présentant une malformation cardiaque isolée (68). De plus, une hyperméthylation du gène *GATA4* a été trouvée chez les fœtus atteints du syndrome de Down, avec ou sans malformation cardiaque congénitale, ainsi que chez les fœtus atteints de malformations cardiaques isolées (68). La méthylation de l'ADN a également été étudiée dans la tétralogie de Fallot (TOF) et la malformation cardiaque congénitale de communication interventriculaire (CIV) (69). Globalement, une méthylation aberrante des îlots CpG au niveau des promoteurs, des exons et des amplificateurs cardiaques ainsi qu'une altération de la méthylation conduisant à un épissage différentiel ont été observées (69). Ces études ont permis l'identification d'un gène candidat, soit le gène *SCO2* (Synthesis Of Cytochrome C Oxidase 2), codant pour une cytochrome oxydase, dont l'hyperméthylation de la région promotrice a été corrélée avec une expression réduite (69). *SCO2* a précédemment été associée à l'encéphalocardiomyopathie infantile et son inactivation chez la drosophile cause le rétrécissement du tube cardiaque et la cardiomyopathie dilatée augmentant avec l'âge (70, 71). Une hyperméthylation du promoteur de *ECE2*, un substrat de l'endothéline qui est impliqué dans le développement du cœur, a aussi été identifiée chez des patients atteints de CIV (69).

La déplétion de plusieurs régulateurs épigénétiques a également été identifiée dans plusieurs maladies cardiaques. La déplétion de *Ezh1* et de *Ezh2* (Enhancer of Zeste 1/2 Polycomb Repressive Complex Subunit), des composants du complexe régulateur polycomb, cause la CIV, la trabéculatation anormale de la chambre cardiaque et l'hypoplasie du cœur chez la souris (72). La délétion de *Smyd1* (SET and MYND Domain Containing 1), une histone méthyle transférase (HMTs), chez la souris cause l'échec de la maturation des cardiomyocytes et l'hypoplasie ventriculaire (73). Il a également été démontré que l'activité acétyltransférase de p300 est nécessaire au développement de structures dérivées du coussin atrioventriculaire (feuillets valvulaires, partie membraneuse du septum ventriculaire et septum atrioventriculaire) et du myocarde ventriculaire (74). En effet, l'inhibition de la fonction acétyltransférase de p300 chez la souris cause la diminution de l'épaisseur du myocarde au niveau des deux ventricules, le sous-développement des feuillets valvulaire, la CIV et la malformation cardiaque congénitale de communication interauriculaire (CIA) (74). La déplétion de *Nsd2* (Nuclear Receptor Binding

SET Domain Protein 2) aussi connu sous le nom de *Whsc1*, l'histone méthyle transférase qui méthyle H3K36, cause également la CIA et la CIV chez la souris (75). Des mutations dans les gènes *KMT2D* (Histone-lysine N-methyltransferase 2D) et *KDM6A* (Lysine Demethylase 6A) ont également été retrouvées chez des patients atteints du syndrome de Kabuki, syndrome chez lequel on retrouve la CIA et/ou la CIV ainsi que la coarctation de l'aorte dans environ 55% des cas (76-78). Finalement, la mutation du gène *CHD7* (Chromodomain helicase DNA-binding 7), un facteur de remodelage de la chromatine, cause le syndrome CHARGE dans lequel des malformations cardiaques sont présentes dans 75% des patients (79).

## **1.2 – Système de conduction**

### **1.2.1 – Anatomie du système de conduction**

L'activité du système circulatoire dépend elle-même du système de conduction du cœur qui est essentiel à la génération et à la transmission des influx nerveux. Ce système comporte deux principaux composants, soit un système de conduction lente et un système de conduction rapide. Le système de conduction lente est constitué du nœud sinusal et du nœud atrioventriculaire (80). Le nœud sinusal est le stimulateur principal du cœur et est situé dans l'oreillette droite. Il génère l'impulsion permettant d'amorcer la contraction du cœur. Le nœud atrioventriculaire, quant à lui, est situé entre les oreillettes et les ventricules et permet la conduction électrique entre ces derniers. Le système de conduction cardiaque possède également un système de conduction rapide, le système de conduction ventriculaire (SCV) (80). Ce dernier est constitué du faisceau de His, des branches gauche et droite du faisceau de His et du réseau de fibres de Purkinje. Il coordonne la contraction cardiaque dans l'axe interventriculaire (Figure 2) (4, 80). Le faisceau de His est le prolongement du nœud atrioventriculaire et conduit l'influx nerveux vers les branches gauche et droite du faisceau de His qui, à leur tour, propagent l'influx vers les ventricules gauche et droit respectivement (80). Le réseau de fibres de Purkinje propage ensuite l'influx dans les ventricules (80).

### **1.2.2 – Anatomie et automaticité du nœud sinusal**

Les études portant sur le cœur humain ont permis la découverte d'un groupe de cellules, appelé le nœud sinusal, situé dans la cavité de l'oreillette droite, près de la veine cave supérieure (Figure 6) (4, 81). Dans certains cas plus rares, le nœud peut s'étendre à travers la crête de l'appendice auriculaire droit et occuper le sillon interauriculaire (82). Le nœud sinusal a tout d'abord été défini histologiquement par la présence de myocytes nodaux (cellules pâles, riches en glycogène avec un sarcomère et un réticulum sarcoplasmique peu développé), de myofibrilles peu développées et de tissus conjonctifs (83-85). Le nœud sinusal a également été caractérisé par l'activité de l'acétylcholine estérase, l'enzyme responsable du clivage de l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans les synapses et par l'expression de HNK-1 (Human natural killer-1), impliqué dans la plasticité neuronale (83). De plus, il a été démontré que les enzymes

de biosynthèse de l'acétylcholine et des catécholamines sont exprimées de manière transitoire dans le nœud sinusal embryonnaire et fœtal et dans d'autres parties du système de conduction.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'organisation du nœud sinusal. Selon le premier modèle, le modèle à gradient, il y a une transition progressive de la taille et des propriétés électriques des cellules stimulatrices entre le centre du nœud sinusal et sa périphérie (86). Les cellules situées au centre sont plus petites et ont une vitesse de stimulation et une vitesse d'ascension plus faible que celles de la périphérie (86). Ces dernières ont un phénotype intermédiaire entre les cellules du centre et les cellules auriculaires (86). Selon le deuxième modèle, le modèle mosaïque, le nœud sinusal est constitué de cellules automatiques ayant une fréquence de stimulation et une configuration du potentiel d'action variable qui leur est propre (87). Contrairement au modèle à gradient, il n'y a pas de distribution préférentielle des petites cellules stimulatrices au centre du nœud sinusal (87). En effet, selon le modèle mosaïque, les cellules stimulatrices ont différents degrés d'automaticité et de configuration du potentiel d'action et sont supposées être distribuées uniformément dans le nœud sinusal (87). Ce modèle indique également la présence de cellules auriculaires dans le nœud sinusal, dont la densité est accrue à la périphérie et minimale au centre (87). Plusieurs études ont montré que le modèle à gradient semble mieux expliquer le comportement électrophysiologique du nœud sinusal. De fait, les cellules de la périphérie ont un profil électrophysiologique différent des cellules du centre (88-92). Toutefois, conformément au modèle mosaïque, des cellules atriales dans la périphérie ainsi qu'un potentiel d'action auriculaire dans le nœud sinusal ont été identifiés sans ambiguïté, suggérant que la réalité est un mélange des deux modèles (93).

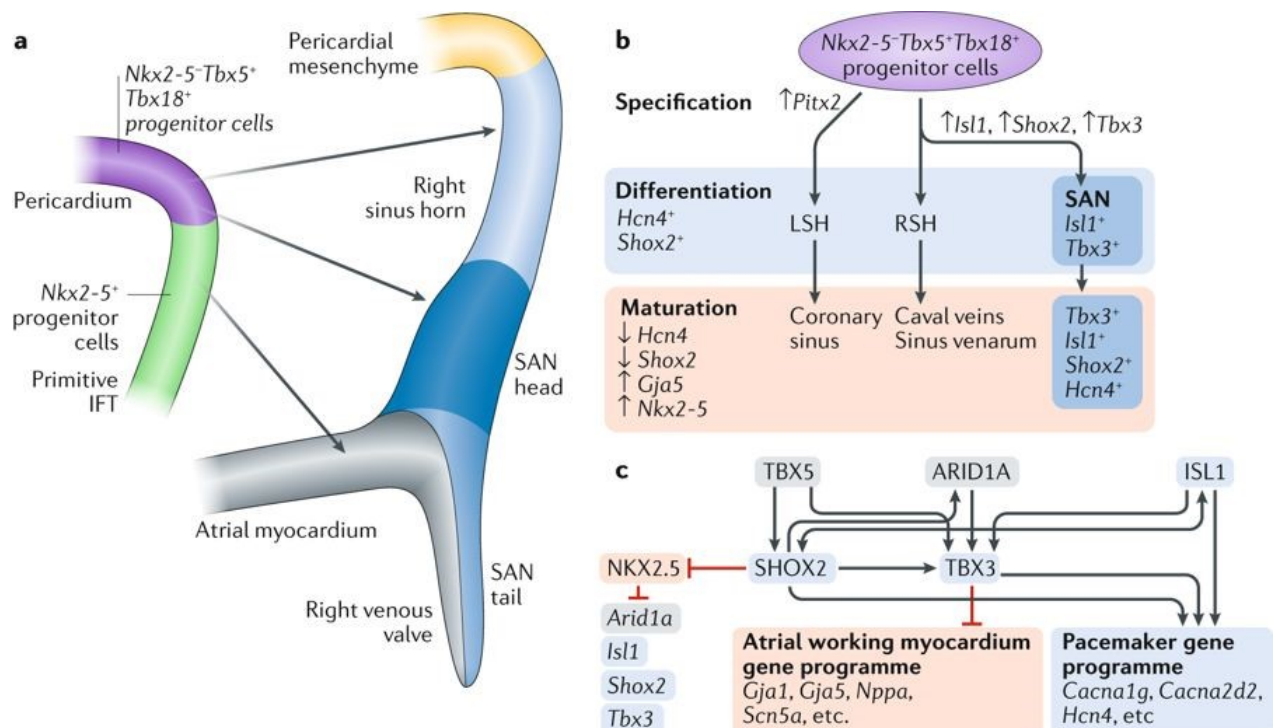
Le nœud sinusal mature est constitué de myocytes primitifs de taille variable qui possèdent peu de filaments contractiles et de fibroblastes entremêlés afin de former une structure allongée en forme de «virgule» qui est constituée d'une «tête» située dans la veine cave supérieure et d'une «queue» qui suit la crête terminale (86, 94, 95). Le nœud sinusal possède également un anneau externe de tissu conjonctif et d'artères qui permet de le protéger fonctionnellement contre la charge résistive de l'oreillette droite à l'exception de deux voies de sortie sino-auriculaires supérieure et inférieure étroites qui permettent au nœud sinusal d'activer l'oreillette (83, 96).

Aujourd'hui, il existe de nombreux marqueurs spécifiques du nœud sinusal qui ont été identifiés grâce aux propriétés électrophysiologiques uniques de ce dernier. En effet, le nœud sinusal exprime les protéines de jonction GAP Cx45 (Connexin-45), Cx30.2 (Connexin-30.2) et Cx30 (Connexin-30), qui forment des jonctions de faible conductance essentielles à la résistance intercellulaire élevée requise pour protéger le nœud sinusal de l'influence hyperpolarisante de suppression de l'oreillette (97, 98). L'expression de SCN5A (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5), le principal canal sodique impliqué dans la dépolarisation et la conduction rapides, est faible dans le nœud sinusal en comparaison à celle observée dans les myocytes auriculaires adjacents (99). Le nœud sinusal exprime aussi fortement HCN4 (Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 4), le canal responsable du courant  $I_f$ , qui joue un rôle clé dans l'activité stimulatrice du nœud sinusal (100, 101). Il y a également absence d'expression de *nppa* dans le nœud sinusal, alors que ce gène est exprimé dans les myocytes auriculaires adjacents (99). Finalement, TBX3 (T-Box Transcription Factor 3) est spécifiquement exprimé dans le nœud sinusal mature et en développement ainsi que dans le système de conduction (102, 103).

### 1.2.3 – Contrôle génétique du développement du nœud sinusal

Le développement embryonnaire du nœud sinusal requiert des cascades de transcription qui impliquent des facteurs de transcription à boîte T et plusieurs autres facteurs qui doivent être orchestrés très précisément pour réprimer le programme génétique menant au développement du myocarde (Figure 6) (104-107). Tout d'abord, le nœud sinusal et les cornes sinusales se développent à partir de cellules progénitrices exprimant *Tbx18*, mais pas *Nkx2.5* (102, 108-112). Les cellules exprimant *Nkx2.5* contribuent plutôt à la formation du myocarde fonctionnel (102). L'expression de *Pitx2* (Paired Like Homeodomain 2) dans la corne sinusale gauche réprime la morphologie du *sinus venosus* (région qui donnera naissance au nœud sinusal) et l'expression génique associée, restreignant ainsi le développement du nœud sinusal dans la corne sinusale droite (109). Toutefois, le mécanisme impliqué n'est pas très clair. Ensuite, le facteur de transcription *Tbx5* régule l'expression des gènes du programme stimulateur cardiaque *Bmp4*, *Shox2* (Short Stature Homeobox 2), et *Tbx3* dans la région du futur nœud sinusal (113, 114). L'expression de *Shox2* est essentielle au développement du nœud sinusal et empêche la formation de myocarde fonctionnel dans cette région via l'inhibition de l'expression de *Nkx2.5*

et l'activation de l'expression de *Hcn4*, d'*Isl1* et de *Tbx3* (110, 111, 115). Au début, *Isl1* est exprimé dans les cellules progénitrices cardiaques (car *Isl1* intervient dans le développement du champ cardiaque secondaire tel que décrit au Chapitre 1.1.4), mais son expression se limite ensuite au nœud sinusal, où elle est maintenue jusqu'à l'âge adulte (116, 117). *Isl1* agit en amont dans la cascade de signalisation du nœud sinusal pour réguler l'expression de *Bmp4*, *Hcn4*, *Shox2* et *Tbx3* (118, 119). *Isl1* est elle-même une cible directe de *Shox2*, ce qui implique l'existence d'une boucle de rétroaction positive entre *Isl1* et *Shox2* (120). L'expression de *Tbx3* est spécifiquement maintenue dans le nœud sinusal, avant et après la naissance, afin de supprimer l'expression des gènes du myocarde fonctionnel, soit *Gja1* (*Cx43*), *Gja5* (*Cx40*), *nppa* et *Scn5a* (103, 121). L'expression de *Tbx3* est également nécessaire à l'expression des gènes du programme stimulateur cardiaque, *Hcn4*, *Cacnac1c* (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C), *Cacna2d2* (Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 2) ainsi que d'autres marqueurs du nœud sinusal (103, 122). L'expression de *Tbx3* est aussi régulée par *Baf250a* (BRG1-Associated Factor 250a) (123). *Baf250a*, en combinaison avec *Tbx3* et *Hdac3* supprime l'expression de *Nkx2.5* dans le nœud sinusal (123).





sinusal est restreint dans le côté droit du sinus venosus grâce à l'expression de *pitx2* dans le côté gauche **(b)**. Schéma de la régulation transcriptionnelle du développement du nœud sinusal **(c)** (107).

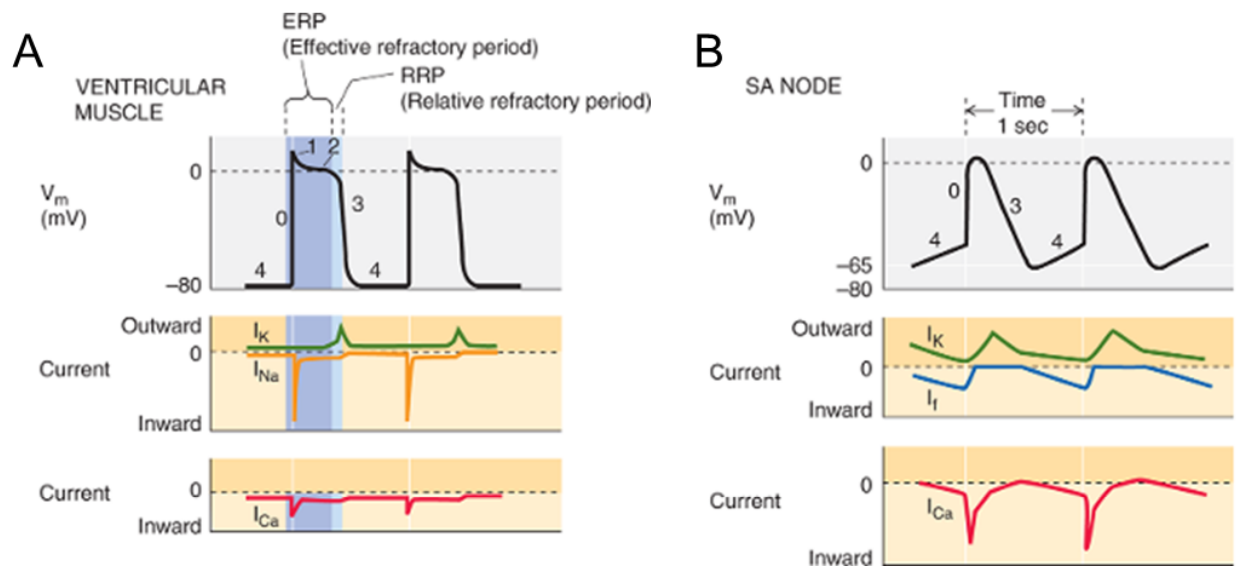
### **1.2.4 – Fonctions du nœud sinusal**

La fonction du nœud sinusal repose sur l'activation du potentiel d'action cardiaque responsable des battements du cœur. Les cellules constituant le nœud sinusal se dépolarisent de façon spontanée et déclenchent des potentiels d'action cardiaques par propagation de la dépolarisation le long des oreillettes et ventricules selon un rythme régulier (124). Ce mécanisme de propagation repose sur le fait que les cellules cardiaques sont toutes reliées les unes aux autres par l'intermédiaire de jonctions de type gap, ce qui permet la propagation du potentiel d'action d'une cellule à l'autre (2). Cette dépolarisation résulte, en partie, de l'activation du courant stimulateur ( $I_f$ ) retrouvé uniquement dans les cellules du nœud sinusal et qui est induit par les canaux HCN4 ainsi que par l'interaction de ce courant avec les courants  $Ca^{2+}$  ( $I_{CA}$ )  $Na^+$  ( $I_{NA}$ ) et  $K^+$  ( $I_K$ ) (124, 125).

### **1.2.5 – Potentiel d'action cardiaque**

Les différentes parties du cœur possèdent un potentiel d'action cardiaque dont le temps d'initiation, la durée et la forme diffèrent et reflètent leurs fonctions distinctes (2). L'activation du potentiel d'action cardiaque se divise en cinq phases distinctes. La phase 0 correspond à l'ascension du potentiel cardiaque qui se traduit par une période de dépolarisation (126). La dépolarisation rapide du potentiel d'action a lieu dans les muscles auriculaires et ventriculaires ainsi que dans les fibres de Purkinje qui sont situées à l'intérieur de la paroi ventriculaire et dépend du courant  $Na^+$  couplé au courant  $Ca^{2+}$  (Figure 7A) (2). Dans le nœud sinusal et le nœud atrioventriculaire, la dépolarisation est seulement due au courant de  $I_{CA}$  et sera, par conséquent, plus lente (Figure 7B) (2). La phase 1 est une phase de repolarisation rapide qui résulte de l'arrêt de la dépolarisation due à l'inactivation presque totale des courants de  $I_{CA}$  et  $I_{NA}$  et à l'activation du courant potassique transitoire sortant ( $I_{to}$ ) et de l'échangeur NCX1 (Sodium/Calcium Exchanger 1) (2, 126). La phase 2 est une phase plateau au cours de laquelle le potentiel d'action reste stable. Cette phase repose sur l'équilibre entre de petits courants  $I_{NA}$  et  $I_{CA}$  et des courants  $K^+$  hyperpolarisants (126). À la phase 3, la réduction des courants de  $I_{CA}$  et  $I_{NA}$  ainsi que l'augmentation du courant  $I_K$  contribuent à la repolarisation des myocytes (126). Vers la fin de

la phase 3, les actions de repolarisation du courant  $I_K$  sont contrecarrées par un courant  $I_{NCX}$  entrant produit par l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  fonctionnant dans son mode d'extrusion du  $Ca^{2+}$  (126). La phase 4 constitue la phase diastolique du potentiel d'action, soit le relâchement du cœur, qui dépend de l'activité de stimulateur cardiaque du nœud sinusal. Plus le potentiel diastolique est négatif, plus il est à son maximum (2). Cette phase requiert les courants  $I_{Ca}$  et  $I_{Na}$  ainsi que le courant stimulateur,  $I_f$ , qui est responsable de l'activité de stimulateur cardiaque des cellules du nœud sinusal, des cellules du nœud atrioventriculaire et des fibres de Purkinje (2). Le courant  $I_f$  résulte de l'activité des canaux ioniques non spécifiques encodés par les gènes *HCN1* (Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 1), *HCN2* (Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 2) et *HCN4* qui permettent le passage de différents ions et qui sont fortement exprimés dans le nœud sinusal (125).



**Figure 7. Phases du potentiel d'action cardiaque.** Phase du potentiel d'action du muscle ventriculaire (A) et du nœud sinusal (B). Phase 0 : Dépolarisation, Phase 1 : Repolarisation rapide, Phase 2 : Phase plateau, Phase 3 : Repolarisation et Phase 4 : Phase de repos.  $I_K$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$  et  $I_f$  représentent les différents courants impliqués dans le potentiel d'action (2).

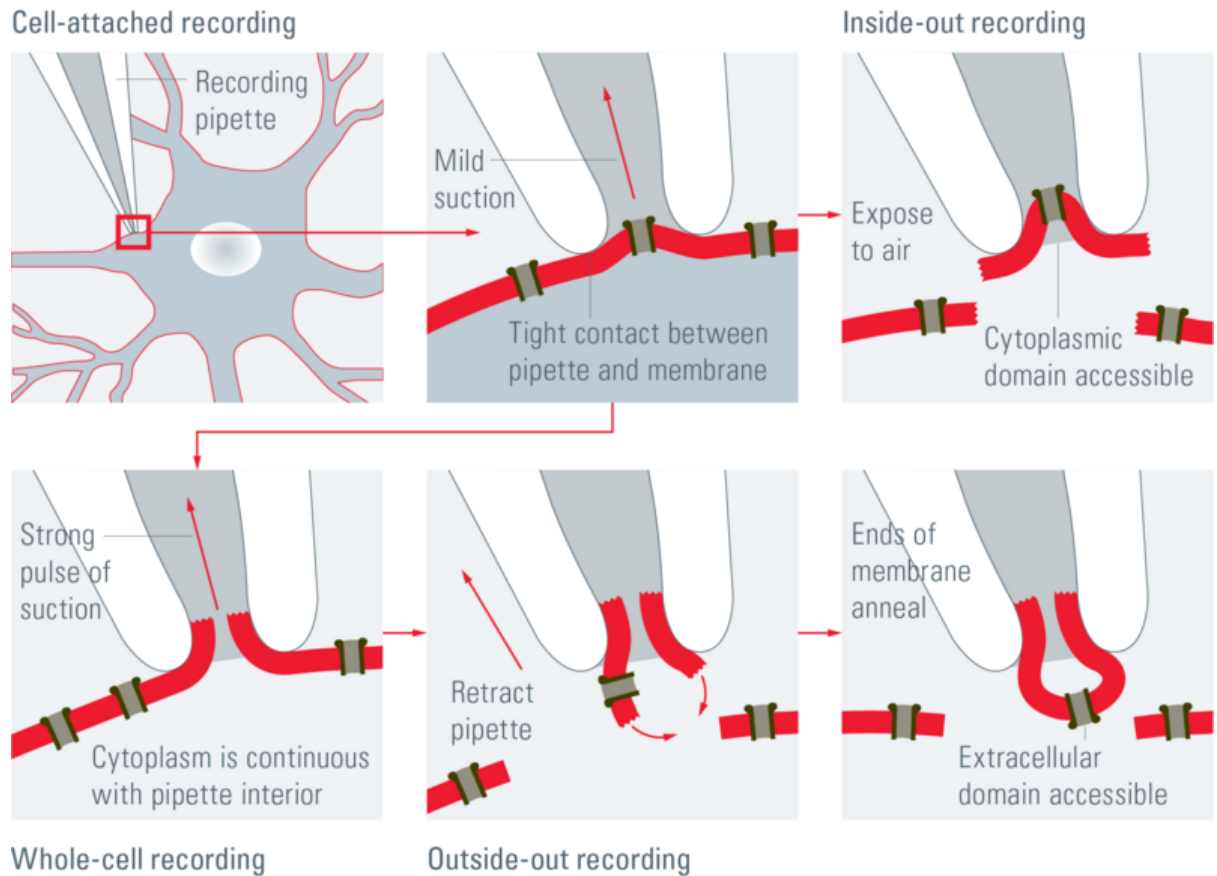
Les potentiels d'action cardiaques dépendent de 4 courants membranaires majeurs qui sont dépendants du temps et de la tension soit le courant  $Na^+$  dépendant des canaux sodiques Nav1.5 (SCN5A), le courant  $Ca^{2+}$  dépendant des canaux calciques de type L Cav1.2 (CACNA1C) le courant  $K^+$  dépendant des canaux potassiques HERG/miRP1 (KCNH2/KCNE2, Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2/Potassium Voltage-Gated Channel

Subfamily E Regulatory Subunit 2), KvLQT1/minK (KCNQ1/KCNE1, Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1/Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 1), Kv4.3 (KCND3, Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3), GIRK (KCNJ5, G Protein-Activated Inward Rectifier Potassium Channel) et  $K_{ATP}$  (KCNJ11, ATP-Sensitive Inward Rectifier Potassium Channel) et le courant stimulateur dépendant des canaux sodiques/potassiques HCN (2).

### **1.2.6 – Électrophysiologie : Principe et application en recherche**

L'analyse des potentiels d'action cardiaques repose sur une technique appelée l'électrophysiologie qui permet l'étude des propriétés électriques des cellules ou des tissus biologiques. L'outil clinique standard utilisé pour mesurer l'activité électrique du cœur est l'électrocardiogramme (ECG). L'ECG permet d'enregistrer les petits signaux extracellulaires résultant du mouvement du potentiel d'action à travers les myocytes (2). L'ECG est grandement utilisé afin de détecter les troubles du rythme ou de la conduction cardiaque, l'hypertrophie auriculaire ou ventriculaire, la péricardite et l'infarctus du myocarde (127).

L'électrophysiologie peut également être étudiée sur une seule cellule en utilisant une technique appelée le «Patch clamp» inventée par Neher et Sakmann (Figure 8) (128, 129). Pour ce faire, un contact étroit est créé entre une pipette (remplie d'une solution électrolyte et connectée à une électrode reliée à un amplificateur) et la membrane plasmique de la cellule (128). L'application d'une succion avec la pipette crée un joint d'étanchéité très résistant entre le verre et la membrane cellulaire qu'on appelle le «patch» (2). La minuscule zone de membrane dans le patch est intacte et permet d'enregistrer l'activité des canaux dans ce dernier (2). Une autre électrode est placée dans un bain (dont la composition varie selon le type d'expérience) entourant la cellule en tant qu'électrode de référence (128). Ceci permet de créer un circuit électrique entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode du bain avec la cellule d'intérêt entre les deux (128). Ce type d'enregistrement se nomme enregistrement attaché à la cellule. Il existe également d'autres types d'enregistrement qui sont détaillés à la Figure 8. Ces différentes configurations peuvent être utilisées pour étudier les interactions médicament-canal, les processus médiés par les récepteurs et les mécanismes de régulation biochimiques qui se produisent à la surface interne ou externe des membranes cellulaires (2).



**Figure 8. Méthodes de patch clamp.** Enregistrement attaché à la cellule : un «patch» étanche est créé par succion entre la membrane cellulaire et la pipette. Enregistrement de la cellule entière : l'application d'une deuxième succion, de plus forte intensité, permet de briser la membrane cellulaire et d'avoir accès au cytoplasme afin d'enregistrer l'activité électrique de la cellule entière. Enregistrement à l'envers: lorsque la pipette est attachée à la cellule, elle est rétractée et le «patch» est séparé du reste de la membrane exposant ainsi la surface cytosolique de la membrane. Enregistrement de l'extérieur vers l'intérieur : lorsque la pipette est attachée à la cellule en mode d'enregistrement de cellule entière, la pipette est retirée, faisant en sorte que les deux petits morceaux de membrane à l'intérieur se reconnectent et forment une vésicule avec le côté cytosolique face à la solution dans la pipette. (129).

### **1.3 – Maladie du nœud sinusal (MNS)**

Des anomalies au niveau de la structure du système de conduction et/ou de la génération du potentiel d'action cardiaque peuvent causer de nombreuses maladies, incluant la maladie du nœud sinusal. Cette dernière résulte de plusieurs problèmes associés à la formation et à la propagation de l'impulsion cardiaque en provenance du nœud sinusal, l'empêchant, de ce fait, d'assurer sa fonction de stimulateur cardiaque de façon adéquate (130). Les principales manifestations cliniques de cette maladie sont l'arythmie (trouble du rythme cardiaque), la bradycardie (ralentissement des battements cardiaques), la tachycardie (accélération des battements cardiaques), la pause ou l'arrêt du nœud sinusal et le blocage de la sortie sinoatriale. Il peut également en résulter une réponse cardiaque inadéquate face à l'exercice ou au stress (130).

#### **1.3.1 – Prévalence de MNS**

La MNS survient généralement chez les adultes et l'incidence augmente avec l'âge, mais les personnes de tout âge peuvent être affectées, incluant les enfants et les nouveau-nés (131). L'âge moyen des personnes atteintes de cette maladie est de 68 ans, et il ne semble pas y avoir de prévalence significative en ce qui a trait au sexe (131).

#### **1.3.2 – Étiologie de MNS**

La majorité des cas de MNS sont idiopathiques et résultent de facteurs multiples. Plusieurs causes intrinsèques peuvent causer la MNS, incluant la fibrose dégénérative du nœud sinusal, la dysfonction des canaux ioniques et le remodelage du nœud sinusal (132). Certaines maladies infiltratives, comme certaines maladies des tissus connectifs, l'hémochromatose, la sarcoïdose et l'amyloïdose peuvent également causer des dysfonctions du nœud sinusal (133). Il y a également plusieurs facteurs extrinsèques qui peuvent exacerber la MNS, comme l'utilisation de certains médicaments ( $\beta$ -Bloquants, bloquants des canaux à calcium, antiarythmiques, lithium) et les perturbations métaboliques qui perturbent la fonction du nœud sinusal (132, 134). Certaines études ont identifié des mutations autosomales dominantes de *HCN4* ainsi que des mutations hétérozygotes composées de *SCN5A* chez les patients atteints de MNS (135-137). Toutefois, les causes génétiques de la maladie restent peu connues (137-141).

### **1.3.3 – Symptômes et diagnostic de MNS**

Les symptômes de la maladie du nœud sinusal sont très variés et touchent principalement le système cardiovasculaire et le système nerveux central, mais ils peuvent également toucher les autres systèmes (142). De ce fait, le diagnostic de la maladie est difficile puisque certains de ces symptômes (la fatigue, l'irritabilité, les pertes de mémoire, les étourdissements les palpitations et les défauts cognitifs) sont présents dans d'autres maladies associées au système nerveux central, ce qui peut engendrer un mauvais diagnostic (143). Il est possible de procéder au diagnostic par ECG (143-145). En effet, certaines manifestations propres à la maladie du nœud sinusal peuvent être détectées, comme la longue pause suivant la tachyarythmie de l'oreillette, la pause de trois secondes suivant le massage de la carotide ainsi que le rythme rentrant du nœud sinusal (143). Cependant, la variabilité et l'intermittence des symptômes peuvent rendre difficile ce type de diagnostic (143-145). La méthode de diagnostic la plus utilisée est le test Holter qui requiert le port d'un appareil d'ECG portatif pendant 24h à 48h (145). Au cours du test, le patient doit tenir un journal détaillé de ses activités et de ses symptômes afin d'évaluer s'il y a corrélation avec le résultat de l'ECG (142). Les tests d'exercice peuvent également être utiles pour étudier la réponse du nœud sinusal à la demande physique, car les patients atteints de la maladie du nœud sinusal peuvent souffrir d'insuffisance chronotrope, c'est-à-dire qu'ils peuvent présenter une diminution de la fréquence cardiaque en réponse à l'exercice en comparaison aux personnes saines (143).

### **1.3.4 – Traitements de MNS**

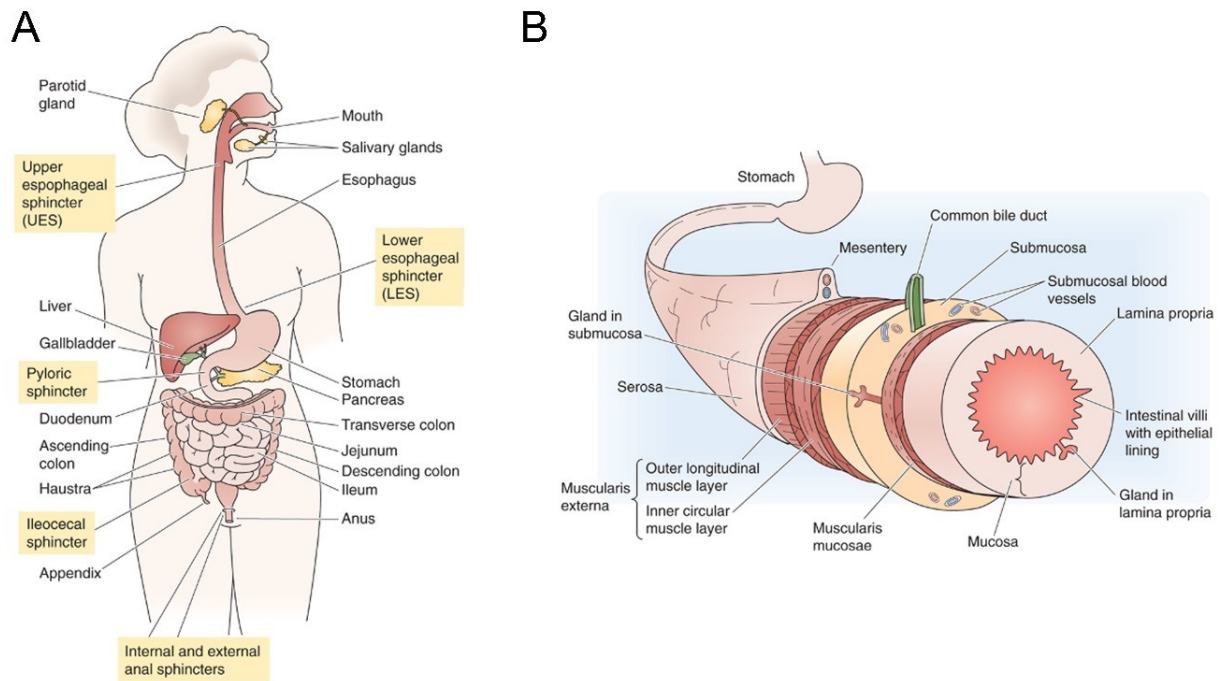
Le seul traitement possible de la maladie du nœud sinusal est l'implantation d'un stimulateur cardiaque (143). L'implantation est généralement bien tolérée et améliore la qualité de vie du patient, avec une normalisation quasi complète de l'espérance de vie (143).

## **1.4 – Système gastro-intestinal**

Maintenant que la caractérisation des systèmes circulatoires et de conduction a été faite au niveau de la structure, du développement des fonctions et des anomalies, celle de l'intestin, soit l'autre organe impliqué dans le syndrome CAID, sera adressé.

### **1.4.1 - Structure et rôles du système gastro-intestinal**

Le système gastro-intestinal est responsable de la digestion et de l'absorption des nutriments (2). Il est constitué d'organes creux qui s'étendent de la bouche à l'anus ainsi que des glandes et organes de sécrétion qui leur sont associés, soit les glandes salivaires, le pancréas et le foie ( Figure 9A) (2). La bouche et l'oropharynx coupent la nourriture en petits morceaux, les lubrifient et amorcent leur passage vers l'œsophage. Ils entament également la digestion des hydrates de carbone et des gras (2). L'œsophage conduit ensuite les morceaux à l'estomac où des protéases et des acides sont sécrétés afin de commencer la digestion (2). Cette dernière se poursuit dans le petit intestin où l'absorption des nutriments commence (2). Le gros intestin, quant à lui, absorbe les fluides et les électrolytes et sert de lieu de stockage de la matière fécale jusqu'à son excrétion par l'anus (2). L'activité motrice du système gastro-intestinal est essentielle à la vie et possède plusieurs fonctions. Tout d'abord, elle est responsable des contractions qui augmentent le mélange et facilitent la digestion et l'absorption des nutriments (2). Ensuite, elle permet la propulsion du contenu luminal (aliments ou produits de la digestion) grâce à une phase progressive de relaxation suivie de contractions péristaltiques ainsi qu'à l'élimination des produits non digérés ou absorbés (2). Finalement, elle permet à certains organes, soit l'estomac et l'intestin, de servir de réservoir grâce aux sphincters qui séparent ces derniers du reste du système (2).



**Figure 9. Structure et glandes du système gastro-intestinal humain (A) et structures de la paroi intestinale (B).** De l'intérieur vers l'extérieur: la couche épithéliale et les cryptes, la lamina propria, la muscularis mucosae, la sous-muqueuse, les couches musculaires circulaire et longitudinale de la muscularis externa et la séreuse (2).

La paroi intestinale est composée de plusieurs structures (Figure 8B) (2). La muqueuse est constituée d'une couche épithéliale ainsi que d'une couche sous-jacente de tissus conjonctifs appelée la *lamina propria* (2). Cette dernière est composée de capillaires, de neurones entériques, de cellules immunitaires telles les mastocytes ainsi que d'une mince couche de muscles lisses, la *lamina muscularis* (2). Pour ce qui est de la couche de cellules épithéliales, la plupart des cellules qui la constitue possèdent des microvillosités sur leurs faces apicales, permettant ainsi d'augmenter sa surface. La couche de cellules épithéliales peut également augmenter sa surface en s'évaginant pour former des villosités ou en s'invaginant pour former des glandes (ou cryptes) (2). Enfin, à l'échelle macroscopique, la muqueuse est organisée en grands plis (2). La sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif lâche et de plus gros vaisseaux sanguins et contient également des glandes qui sécrètent des substances dans la lumière gastro-intestinale (2). La couche musculaire, appelée *muscularis externa*, comprend deux couches de muscles lisses (2). La couche interne est circulaire, tandis que la couche externe



est longitudinale (2). Des neurones entériques sont présents entre ces deux couches musculaires. Finalement, la séreuse est une couche enveloppante de tissu conjonctif recouverte de cellules épithéliales squameuses (2). Afin de donner naissance à toutes ces cellules et structures, le système gastro-intestinal doit d'abord se développer au cours de l'embryogenèse.

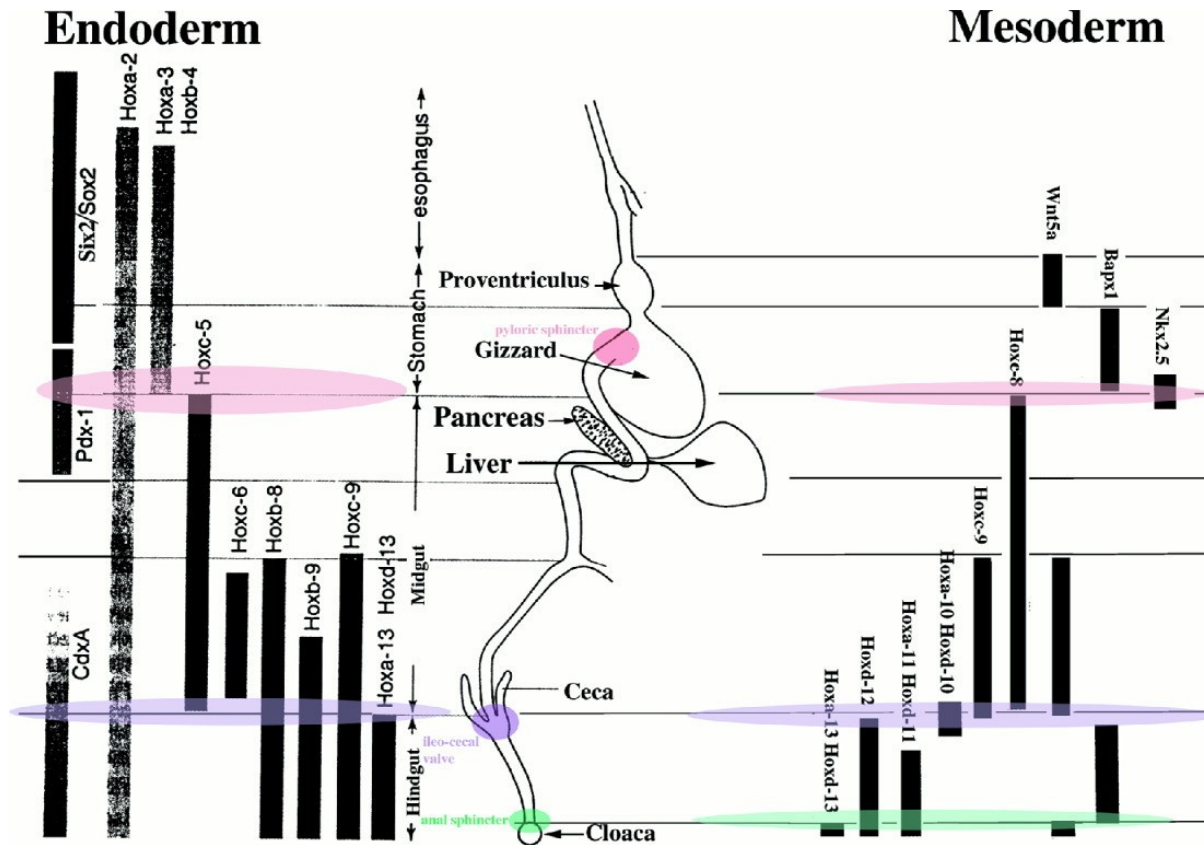
### 1.4.2 Développement embryonnaire du système gastro-intestinal

Le développement embryonnaire du système gastro-intestinal a largement été étudié chez le poulet et la souris. Au cours de l'embryogenèse, au fur et à mesure que l'embryon se développe, ce dernier bascule en position fœtale. De ce fait, l'ectoderme est présent à l'extérieur de l'embryon alors que l'endoderme, enveloppé de mésoderme, est à l'intérieur de l'embryon (146). L'endoderme définitif subit une invagination dans la région antérieure pour former le portail intestinal antérieur rapidement suivi d'une seconde invagination dans la région postérieure de l'endoderme afin de former le portail intestinal caudal. Les portails intestinaux antérieur et caudal migrent l'un vers l'autre et fusionnent pour fermer le tube intestinal à E9.0 (146-148). Au jour embryonnaire E9.5, le tube intestinal devient un simple épithélium pseudostratifié. De E9.5 à E 13.5, l'épithélium et le mésenchyme prolifèrent rapidement, permettant ainsi l'élongation, l'augmentation de la circonférence et l'augmentation de la zone luminale du tube intestinal. La formation des couches de muscles lisses entourant le tube intestinal pour structurer le péristaltisme a également lieu pendant cette période de développement précoce. La différenciation des muscles lisses commence autour de E11 et se poursuit selon une onde proximale distale le long de l'intestin. À E12, une couche de cellules mésenchymateuses se circularise et forme une couche distincte de muscles circulaires (149, 150). Au cours des 48 heures suivantes, trois couches distinctes de muscles lisses sont formées: le muscle lisse circulaire et le muscle lisse longitudinal de la *muscularis propria* et le muscle lisse longitudinal de la *muscularis mucosa*. Le système nerveux entérique (SNE), qui contrôle les contractions musculaires responsables du péristaltisme, commence son développement à E7.5 et se termine vers E14. Le développement du SNE sera discuté plus en détails à la section 1.4.2. La vascularisation de l'intestin se produit simultanément au développement du SNE à E9.5 (151). Le mésothélium séreux commence à se former à la surface de l'intestin à E11 (151). À E12.5, les cellules mésothéliales subissent une endoMT et pénètrent dans l'espace sous-mésothélial de l'intestin. Elles se différencient ensuite en muscles lisses vasculaires du réseau

vasculaire nouvellement formé des artères et des veines intestinales (152). Les villosités commencent à se former à E14.5 (153). Ces dernières émergent dans une onde proximale distale, apparaissant d'abord dans le duodénum et se propageant dans l'iléon en l'espace de 36 h (153). Le développement spatio-temporel du système gastro-intestinal est très précisément régulé par des voies de signalisation spécifiques.

### **1.4.3 Voies de signalisation et régulation transcriptionnelle du développement du système gastro-intestinal**

Des études chez le poulet ont démontré que la spécification globale du tube intestinal dépend d'un gradient d'acide rétinoïque couplé à la voie FGF en provenance du mésoderme qui induit l'expression de facteurs de transcription spécifiques dans les différentes régions de l'endoderme selon l'axe antéro-postérieur (Figure 10) (147, 154). L'acide rétinoïque induit *Pdx1* (Pancreatic And Duodenal Homeobox 1), un gène essentiel au développement du duodénum, du pancréas et du foie ainsi que l'expression du gène *Sox2* (SRY-Box 2) dans les précurseurs de la partie antérieure du tube intestinal (œsophage et estomac) (154, 155). Des concentrations encore plus élevées d'acide rétinoïque induisent l'expression de *CdxA* (Caudal Type Homeobox 2) dans le domaine postérieur de l'endoderme intestinal où ce facteur est requis pour sa spécification (154, 156). De la même façon que l'acide rétinoïque, des niveaux croissants d'activation de la voie FGF, plus particulièrement de *Fgf4*, dans le mésentéron et dans l'intestin postérieur induisent progressivement un destin plus postérieur aux cellules endodermiques (154, 157, 158).



**Figure 10. Facteurs de transcription exprimés dans l'endoderme et le mésoderme qui régulent dans la régionalisation du système gastro-intestinal chez le poulet.** Dans l'endoderme, Pdx1 est essentiel au développement du duodénum, du foie et du pancréas, Sox2 pour le développement de l'œsophage et de l'estomac et CdxA pour le développement du petit et du gros intestin. Autant dans l'endoderme que le mésoderme, l'expression des gènes *Hox* (Homeobox) est responsable de la compartimentalisation du système gastro-intestinal (159).

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est, quant à elle, requise pour le développement du mésentéron et de l'intestin postérieur. Cette dernière empêche l'expression du gène *Hhex* (Hematopoietically Expressed Homeobox) dans la région postérieure de l'endoderme intestinal, prévenant ainsi la formation de l'estomac, du foie et du pancréas. La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est active plus longtemps dans la partie postérieure de l'embryon au fur et à mesure de son allongement créant ainsi des gradients spatio-temporels aidant à établir l'identité des régions intestinales (160). L'endoderme en développement du mésentéron est exposé à la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine à des niveaux inférieurs et pendant des périodes plus courtes, tandis que l'endoderme de l'intestin postérieur est exposé à la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine à des niveaux supérieurs pendant une période plus longue (160, 161). D'autre part, dans

la région antérieure du tube intestinal qui formera le thymus, le pancréas, l'estomac et le foie, la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine doit être inhibée (162). Ceci est accompli via le facteur de transcription Barx1 (BarH-Like Homeobox 1) qui induit l'expression de sFRP1 (Secreted Frizzled Related Protein 1) et sFRP2 (Secreted Frizzled Related Protein 2), des antagonistes de Wnt/ $\beta$ -caténine, dans la région de formation de l'estomac (163). De plus, la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine régule la prolifération dans les domaines inter-villosités qui apparaissent après la morphogenèse des villosités et dans les cryptes de l'intestin adulte (164-169).

La voie de signalisation BMP joue également un rôle dans la spécification des régions endodermiques aux côtés des voies FGF et Wnt/ $\beta$ -caténine. La sécrétion de Bmp4 par le mésenchyme intestinal induit l'expression des facteurs de transcription Sox9 et Nkx2.5 dans le mésoderme antérieur (170). De ce fait, la différenciation en muscles lisses est inhibée et la formation des muscles du sphincter pylorique est induite (170). Bmp2, quant à lui, joue un rôle important dans les interactions mésoderme-endoderme requises pour une formation glandulaire adéquate dans l'épithélium de l'estomac (171).

La voie de signalisation SHH, induit la spécification du mésoderme splanchnique lors du développement antéro-postérieur du tube intestinal (172, 173). Plus précisément, Shh est sécrété par l'endoderme en différentes concentrations à différents endroits et cible le mésoderme qui entoure le tube intestinal. La sécrétion de Shh par l'endoderme de l'intestin postérieur induit un nid d'expression des gènes *Hox* postérieurs dans le mésoderme (Figure 10). Les limites antérieures du motif d'expression des gènes *Hox* délimitent morphologiquement les régions qui formeront le cloaque, le gros intestin, le caecum, le mi-caecum (à la limite du mésentéron/intestin postérieur) et la partie postérieure du mésentéron et permettent la différenciation du mésoderme. La différenciation régionale du mésoderme donne naissance aux muscles lisses. La régulation transcriptionnelle du développement du système gastro-intestinal dépend aussi de la régulation épigénétique.

#### **1.4.4 – Régulation épigénétique du développement du système gastro-intestinal**

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la régulation épigénétique au cours du développement du système gastro-intestinal. Il a été démontré que l'intégrité de l'épithélium

intestinal dépend de la méthylation de l'ADN qui régule la formation de ce dernier en contrôlant la balance entre la prolifération et la différenciation au cours du développement (174, 175). Le développement des muscles lisses dépend également de la régulation épigénétique. En effet, il a été établi que Dnmt1 (DNA methyltransferases 1) joue un rôle essentiel dans la différenciation, l'intégrité et la survie des muscles lisses intestinaux (176). Uhrf1 (Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1), qui est essentiel au recrutement de Dnmt1, joue également un rôle dans le développement de l'épithélium intestinal, des muscles lisses ainsi que dans le développement du SNE (177). La perte fonctionnelle de Uhrf1 chez le poisson-zèbre cause la réduction du nombre de neurones entériques, des changements morphologiques au niveau des neurones ainsi qu'une perturbation sévère des muscles lisses intestinaux, tout comme pour Dnmt1 (177). Par conséquent, Uhrf1 et Dnmt1 semblent agir de concert pour contrôler le développement du système gastro-intestinal et du SNE (177). L'hydroxyméthylation de l'ADN médiée par joue aussi un rôle essentiel dans la régulation épigénétique de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules souches et progénitrices de l'intestin ainsi que dans le renouvellement automatique de l'épithélium intestinal (178).

#### **1.4.5 – Dérégulations épigénétiques impliquées dans les maladies gastro-intestinales**

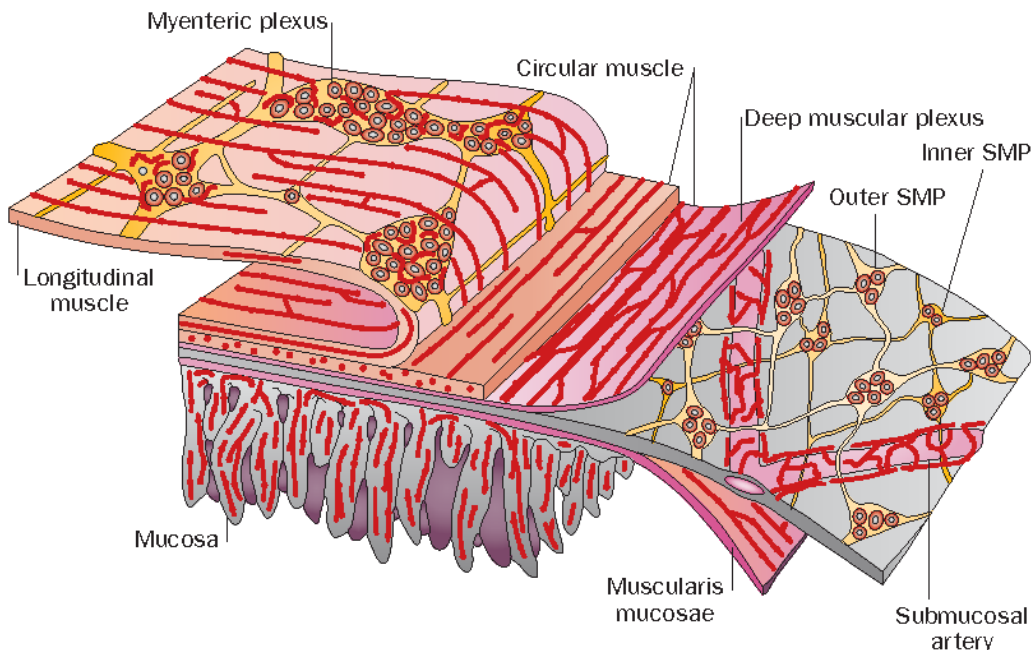
La perturbation des mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement du système gastro-intestinal engendre plusieurs complications et maladies gastro-intestinales. Des études récentes ont montré que l'hypométhylation de l'ADN peut modifier l'identité phénotypique des cellules musculaires lisses, les schémas de croissance et les niveaux d'expression des gènes contractiles, fournissant des preuves préliminaires que la modification de la méthylation de l'ADN joue un rôle dans les pathologies gastro-intestinales (179, 180). En effet, la déplétion de *Dnmt1*, chez la souris cause la réduction du tractus gastro-intestinal et la perte du mouvement péristaltique (176). Ceci résulte de la perte de la tunique musculaire de l'intestin, ce qui entraîne une dilatation intestinale massive et la mort autour du jour postnatal 21 (176). Par conséquent, DNMT1 semble essentiel au développement embryonnaire primaire des cellules musculaires lisses (176). Chez les souris déficientes pour *Dnmt1*, une réduction des transcrits des marqueurs de maturité et de contractibilité, soit *Srf*, *Myh11* (Myosin Heavy Chain 11), et *Tagln* (Transgelin), a aussi été observée (176).

Des changements globaux dans les profils de méthylation de l'ADN ont aussi été retrouvés dans le cancer colorectal et la maladie de Crohn (181, 182). En effet, il a été démontré que l'hypométhylation globale à l'échelle du génome joue un rôle important dans l'instabilité génomique en réactivant les séquences d'ADN transposables (incluant les rétrotransposons *LINE-1*) au cours de la carcinogenèse colorectale (183-185). Cependant, l'influence de l'hypométhylation globale de l'ADN sur le pronostic des patients atteints d'un cancer du côlon reste incertaine. L'hypométhylation de l'ADN a aussi été associée à des maladies du SNE, plus particulièrement à la maladie de Hirschsprung (absence de cellules nerveuses au niveau du gros intestin) (186). Une hyperméthylation au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs a aussi été observée dans le cancer colorectal (187). Il a aussi été démontré que dans les tumeurs colorectales, les promoteurs des gènes MMR (Mismatch Repair) et des répresseurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine de la famille SFRP sont hyperméthylés (188, 189). Les tumeurs colorectales présentent également des gains et des pertes distinctes de H3K4me1 et de H3K27Ac respectivement au niveau amplificateurs en comparaison à l'épithélium normal de la crypte intestinale (190). À l'opposé, une étude effectuée chez les patients atteints de la maladie de Crohn a montré que la méthylation différentielle de l'ADN se trouve majoritairement dans les introns et les régions intergéniques et n'est pas associée aux îlots CpG des promoteurs (182). L'analyse du réseau de gènes différentiellement méthylés a également permis l'identification de voies de signalisation d'intérêt pour expliquer la fibrose associée à maladie de Crohn, comme la structure et l'organisation de la matrice extracellulaire, impliquées dans les troubles fibrotiques de l'intestin, et la signalisation du facteur d'échange du nucléotide guanine qui jouent un rôle dans la cicatrisation des ulcères gastro-intestinaux et dans d'autres maladies fibrotiques (mais pas dans la fibrose intestinale) (191-194).

## 1.5 – Système nerveux entérique

### 1.5.1 Anatomie du système nerveux entérique

Le bon fonctionnement du système gastro-intestinal dépend aussi du SNE. Ce dernier est considéré comme le cerveau de l'intestin. En effet, ce dernier peut réguler seul les fonctions du tube intestinal sans le cerveau et la moelle épinière. Le SNE est organisé en deux anneaux concentriques de ganglions interconnectés, composés à la fois de neurones entériques et de cellules entérogliales, reliées entre elles par des fibres interganglionnaires (Figure 11) (195, 196). L'anneau externe se nomme le plexus myentérique (ou d'Auerbach) et est situé entre les couches musculaires circulaires et longitudinales de la *muscularis externa* tout au long du tube gastro-intestinal (œsophage au rectum) (196). L'anneau interne, le plexus sous-muqueux (ou de Meissner), se trouve entre la *muscularis mucosa* et le muscle circulaire de la *muscularis externa* dans le petit et le gros intestin uniquement (195, 196). Les fibres interganglionnaires qui relient les ganglions forment également des plexus qui innervent le muscle longitudinal, le muscle circulaire, la *muscularis externa*, les artères intrinsèques et la *muscularis mucosa* (196).

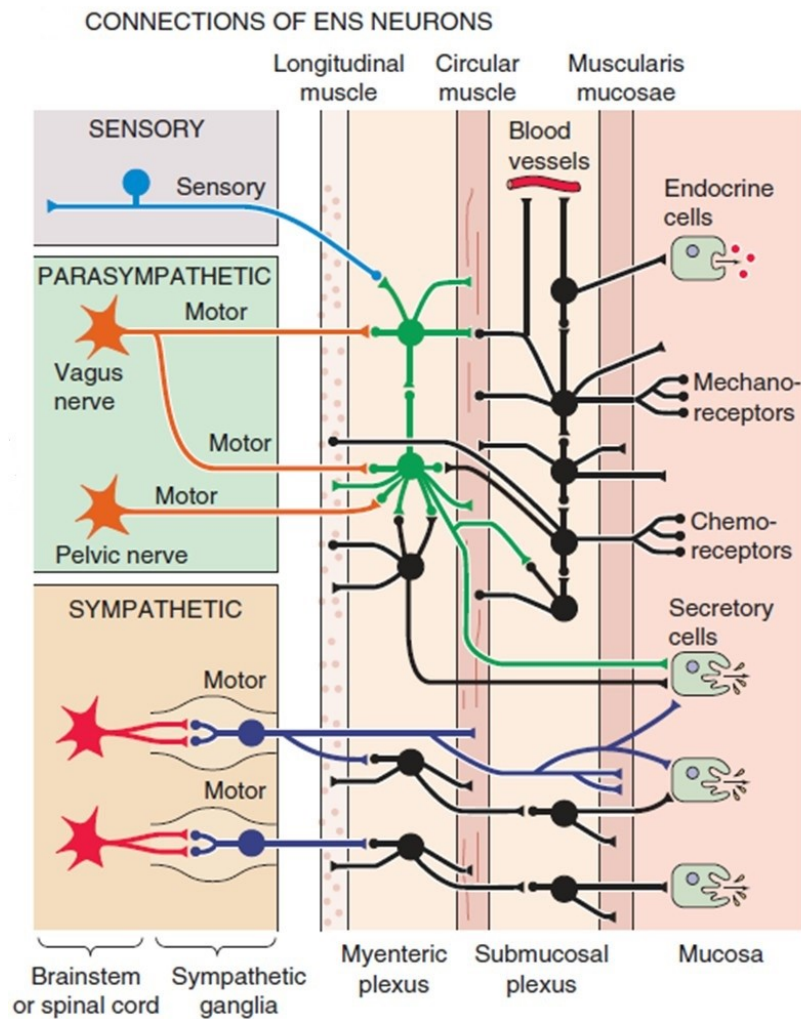


**Figure 11. Structure du système nerveux entérique.** Le SNE est constitué de deux plexus principaux, soit le plexus myentérique (situé entre les couches musculaires circulaires et

longitudinale) et le plexus sous-muqueux (situé entre la *muscularis externa* et la *muscularis mucosa*). SMP : Submucosal plexus (196).

Le SNE est constitué d'environ 100 millions de neurones qui forment un circuit réflexe complet et indépendant qui permet d'assurer la majorité de ses fonctions (Figure 12) (2, 196, 197). Comme pour les autres neurones, l'activité du SNE dépend de la génération de potentiels d'action qui seront décrits à la section 1.5.8. Les neurones sensoriels (ou afférents) surveillent les changements de l'activité luminale (distension), la chimie (le pH, l'osmolalité, les nutriments spécifiques) et la stimulation mécanique (2). Les neurones sensoriels activent ensuite les interneurones, qui relaient des signaux permettant d'activer les neurones sécrétomoteurs efférents (2). Ces derniers stimulent ou inhibent un large éventail de cellules effectrices, soit les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les vaisseaux sanguins sous-muqueux et les cellules endocrines entériques (2).



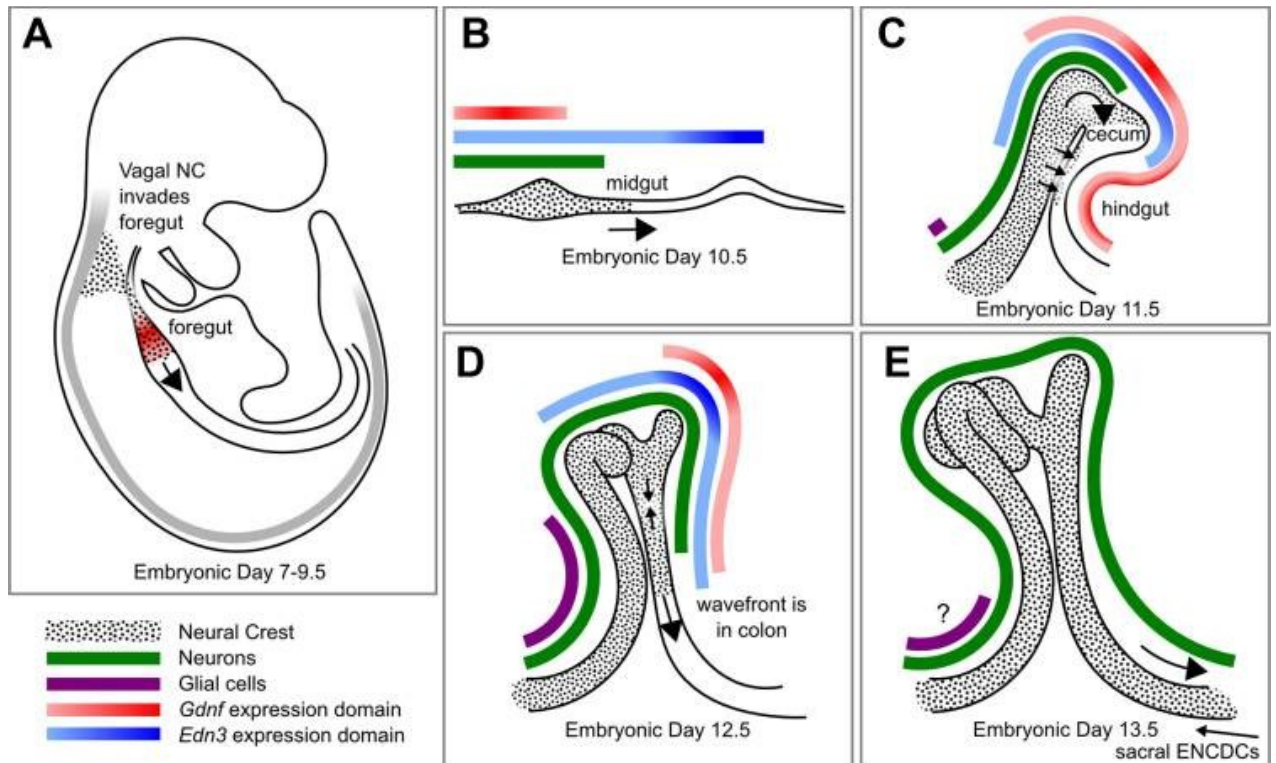


**Figure 12. Schéma des différents types de circuits neuronaux présents dans le SNE.** Le SNE est composé de circuits sensoriels, de connexions interneurales et de neurones sécrétomoteurs efférents. Les divisions parasympathétique et sympathétique du système nerveux autonome modulent le SNE. Certains signaux sensoriels voyagent également de manière centrale depuis le SNE (2).

### 1.5.2 – Développement du système nerveux entérique

Le développement du système nerveux entérique a amplement été étudié chez la souris (Figure 13) (198). De E7 à E9.5, pendant la fermeture du tube neural, le tube intestinal devient innervé grâce à la délamination et la migration des cellules de la crête neurale vagale vers la région adjacente à l'intestin antérieur (Figure 13A) (198, 199). Une fois que ces cellules ont colonisé l'intestin antérieur, elles sont nommées cellules de la crête neurale entérique (CCNEs). Elles migrent de manière rostrale caudale, prolifèrent et se différencient pour donner naissance

à la majorité des neurones et des cellules gliales (198-202). Au cours de ce processus, l'intestin s'allonge et passe d'une forme linéaire (E10.5) à une forme en coude (E11.5) où le mésentéron et l'intestin postérieur sont étroitement accolés (Figure 13B et C) (198, 199). Il s'ensuit un agrandissement de l'appendice caecal et l'allongement de l'intestin entier. À E11 et E12, les cellules de la crête neurale entérique envahissent le côlon en traversant le mésentère et en transitant par le caecum (198, 199). Les populations du caecum et du transmésentère fusionnent ensuite pour former le SNE dans le côlon rostral à E12.5 (Figure 13D) (198, 199). À E13.5, la population du transmésentère peuple le côlon terminal lorsqu'une plus petite population de cellules de la crête neurale entérique en provenance de la crête neurale sacrée pénètre dans l'intestin et migre de manière caudale rostrale le long de l'intestin postérieur, à l'opposé de la direction de migration des cellules dérivées de la crête neurale vagale (Figure 13E)(195, 198, 199). Ces cellules formeront les neurones et les cellules gliales de cette région (203, 204). À E14, les progéniteurs de la crête neurale donnent naissance aux neurones sensoriels et moteurs permettant ainsi la colonisation des précurseurs des cellules de Schwann. La différenciation des neurones et des cellules gliales se produit et se poursuit après la naissance (205, 206). Les cellules de la crête neurale entérique subissent également une migration radiale vers l'intérieur après avoir initialement colonisé l'intestin, formant ainsi les deux couches de ganglions qui comprennent les plexus myentérique et sous-muqueux (207).

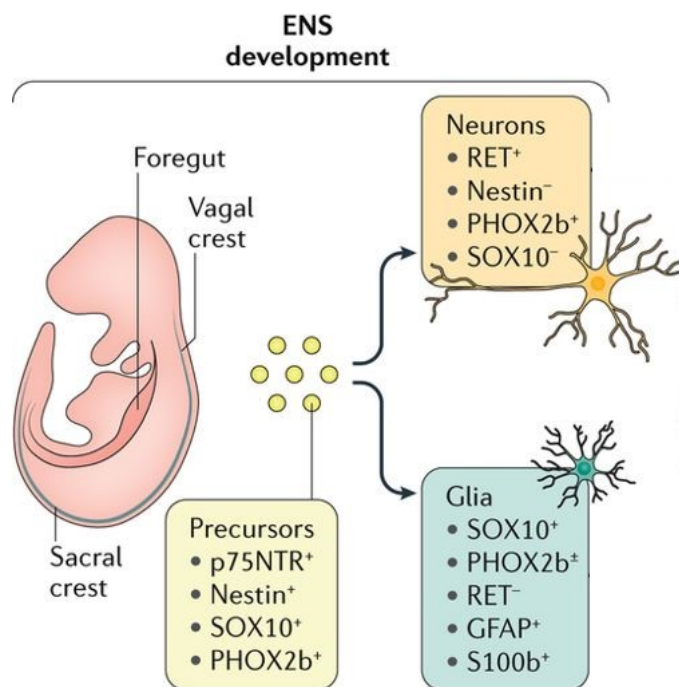


**Figure 13. Colonisation initiale du tractus gastro-intestinal chez la souris par des cellules dérivées de la crête neurale entérique.** Délamination des cellules de la crête neurale et migration dans la région de l'intestin antérieur en développement (A). Ces cellules migrent ensuite rostrocaudalement, prolifèrent et se différencient d'abord en neurones (vert) puis en cellules gliales (violet) (B-E). Tout au long de ce processus, l'intestin s'allonge et se replie (198).

### 1.5.3 – Contrôle génétique du développement du système nerveux entérique

Tout comme pour le système gastro-intestinal, le développement du SNE dépend de plusieurs voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle qui doivent être activées dans des cellules cibles à un moment précis. Les cellules de la crête neurale entérique expriment Sox10 (SRY-Box 10), Ret (Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor), p75 (Nerve Growth Factor Receptor), Phox2b (Paired Like Homeobox), Ednrb (Endothelin Receptor Type B) ainsi que le régulateur de transcription Mash1 (Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1) (195). Ret est un récepteur qui se trouve à la surface des cellules de la crête neurale entérique. La sécrétion de son ligand, GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Factor), par le mésenchyme de l'intestin permet d'attirer les cellules de la crête neurale entérique dans le tube digestif en formation (208, 209). Les cellules de la crête neurale vagale expriment plus fortement

Ret que les cellules de la crête neurale sacrale, ce qui les rend plus invasives (210). Après la migration, les cellules de la crête neurale entérique entrent dans différents stades de maturation (Figure 14) (211). La différenciation neuronale commence avant la différenciation gliale, peu de temps après l'envahissement de l'intestin antérieur (195). À ce stade, il y a diminution de l'expression de Sox10 et de p75, un maintien de l'expression de Ret et de Phox2b et à une induction de l'expression des marqueurs panneuronaux PGP9.5 (Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1), Tuj1 (Neuron-specific  $\beta$ III tubulin), Elavl3 et Elavl4 (Embryonic Lethal, Abnormal Vision, Drosophila, Homolog-Like 3/4) (195). Pour s'engager dans la lignée gliale, les cellules de la crête neurale entérique conservent l'expression de Sox10 et p75, régulent négativement Ret et induisent, en premier lieu, l'expression de Fabp7 (Fatty Acid Binding Protein 7), puis de S100b (S100 Calcium Binding Protein B) et Gfap (Glial Fibrillary Acidic Protein) (195).



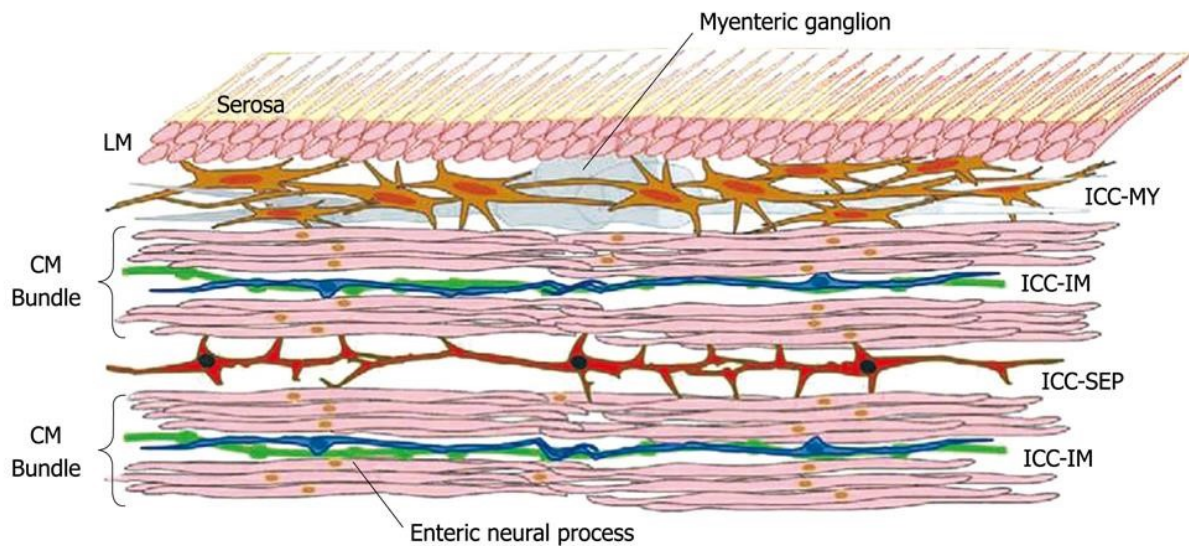
**Figure 14. Différenciation des cellules neuronales et gliales du système nerveux entérique.** Les cellules neuronales et gliales proviennent de cellules progénitrices communes caractérisées par l'expression de p75, de la nestine, de Sox10 et de Phox2b. Les cellules qui donneront naissance aux neurones perdent l'expression de la nestine et exprime RET alors que celles qui donneront naissance aux cellules gliales n'expriment pas RET, mais plutôt GFAP et S100b (Adapté de (211)).

#### **1.5.4 - Fonctions du système nerveux entérique**

Le SNE régule la plupart des fonctions intestinales, soit le péristaltisme en réponse à la distension gastrique, la régulation des flux de fluides transmuqueux et le déclenchement des contractions biliaires (2, 212). Plus précisément, le plexus mésentérique de la paroi intestinale régule le péristaltisme alors que le plexus sous-muqueux est impliqué dans le contrôle des ions et le transport des fluides. Le SNE est également impliqué dans la régulation de la circulation sanguine locale (212).

#### **1.5.5 – Cellules interstitielles de Cajal**

L'activité motrice du système gastro-intestinal dépend du SNE, mais aussi du réseau de cellules interstitielles de Cajal (CICs) (213). Les cellules interstitielles de Cajal sont un type de cellules qui se trouvent dans la paroi intestinale et qui ont été décrites pour la première fois par Cajal comme étant des cellules semblables à des cellules nerveuses à la fin des motoneurones (214). Il existe plusieurs types de CICs (Figure 15). Dans la plupart des régions du système gastro-intestinal, un réseau de CICs est situé dans l'espace intermusculaire au niveau du plexus myentérique entre les couches musculaires circulaire et longitudinale. Ces CICs sont appelées CICs myentériques (CICs-MY). Les CICs intramusculaires (CICs-IM), quant à elles, se trouvent dans les couches musculaires du système gastro-intestinal qui sont innervées préférentiellement par les nerfs moteurs entériques (215). Elles sont étroitement associées aux nerfs moteurs entériques et aux nerfs afférents vagues (215). Finalement, Les CICs septales (CICs-SEP) se situent dans les septas situés entre les faisceaux de muscles circulaires (216).



**Figure 15. Structure et localisation des différents types de CICs.** Les CICs myentériques se trouvent entre les couches musculaires lisses (LM) et circulaires (CM). Les CICs intramusculaires se trouvent dans les faisceaux musculaires circulaires. Les CICs septales se trouvent entre les faisceaux musculaires circulaires (217).

### 1.5.6 – Contrôle génétique du développement des cellules interstitielles de Cajal

L'origine embryologique et la régulation moléculaire des cellules interstitielles de Cajal sont très peu connues. Cependant, il semblerait qu'elles ne proviennent pas des cellules de la crête neurale, mais plutôt des précurseurs mésodermiques mésenchymaux exprimant le marqueur c-KIT (Tyrosine-Protein Kinase Kit) qui semblent requis, selon certaines études chez la souris, pour leur développement (218, 219).

### 1.5.7 - Fonctions des cellules interstitielles de Cajal

Bien que leurs origines soient peu connues, les fonctions de CICs, quant à elle, sont très bien caractérisées. Les CICs contribuent à un grand nombre de fonctions qui sont importantes pour établir le tractus gastro-intestinal comme la production des ondes électriques lentes qui contrôlent les contractions intestinales (voir section 1.5.8), la coordination de la stimulation et de la propagation des ondes électriques lentes, la transduction aux neurones moteurs à partir du SNE pour provoquer la contraction des muscles lisses, et la sensibilité mécanique à l'étirement des muscles lisses gastro-intestinaux (213). Les CICs myentériques sont les cellules

stimulatrices de l'estomac et de l'intestin grêle. En effet, les CICs myentériques et génèrent les potentiels à ondes lentes nécessaires à la contraction des muscles lisses selon un mécanisme rappelant celui du nœud sinusal et résultant d'une augmentation du calcium intracellulaire via la libération du réticulum endoplasmique lisse (220, 221). Les CICs intramusculaires et les nerfs afférents vagues, quant à eux, transmettent les informations mécanoréceptives à partir de la paroi musculaire grâce aux terminaisons intramusculaires et aux terminaisons laminaires intraganglionnaires dans les ganglions myentériques de l'estomac et du duodénum (222, 223). Pour ce qui est des CICs septales, elles forment une voie de conduction cruciale pour la propagation de l'excitation dans les faisceaux musculaires du jéjunum (216, 224).

### **1.5.8 Potentiels d'action gastro-intestinaux**

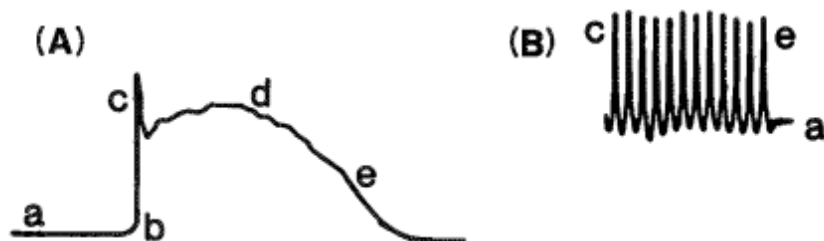
Bien que les propriétés électrophysiologiques du cœur aient été largement étudiées, celles du tractus gastro-intestinal sont relativement moins bien caractérisées. Le système gastro-intestinal possède deux types de potentiel d'action. Le premier est potentiel d'action à ondes lentes. La forme typique d'un potentiel d'action à ondes lentes consiste en une ascension, suivi d'une repolarisation partielle puis d'une phase de plateau. Les potentiels d'action de type ondes lentes contrôlent la motilité de l'estomac, du petit intestin et du muscle circulaire du côlon. Ces ondes lentes sont présentes à tout moment et ont une durée d'au moins 2s et une fréquence constante, caractéristique de chaque organe (225).

Le deuxième type de potentiel d'action est le potentiel d'action en pics. Certains tissus présentent une bipolarisation permanente à -40 mV comme les couches musculaires longitudinales du côlon. Ces tissus ne génèrent pas de potentiels d'action de type ondes lentes, mais génèrent des potentiels d'action similaires à des pics. Cette activité n'est pas omniprésente et dépend du voltage. Un potentiel d'action en pic individuel est généralement d'une durée inférieure à 2s. Ces potentiels d'action se produisent généralement par rafales et peuvent également se présenter sous la forme d'un trait continu de pics. Des potentiels d'action individuels ou des rafales peuvent se produire à des fréquences variables (225).

L'initiation du potentiel d'action à ondes lentes dépend des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  qui ne sont pas de type L. Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type-L sont plutôt impliqués dans la phase d'ascension (Figure 16A, b) et la phase plateau (Figure 16A, c-d). La phase de repolarisation, quant à elle, dépend



des canaux  $K^+$  (Figure 16A, a-e). Pour ce qui est du potentiel d'action en pic, les mêmes canaux sont impliqués. L'ascension dépend des canaux  $Ca^{2+}$  (Figure 16B, c) alors que la phase de repolarisation dépend des canaux  $K^+$  (Figure 16B, e-a) (225, 226).



**Figure 16. Potentiel d'actions (A) à ondes lentes (B) en pics.**

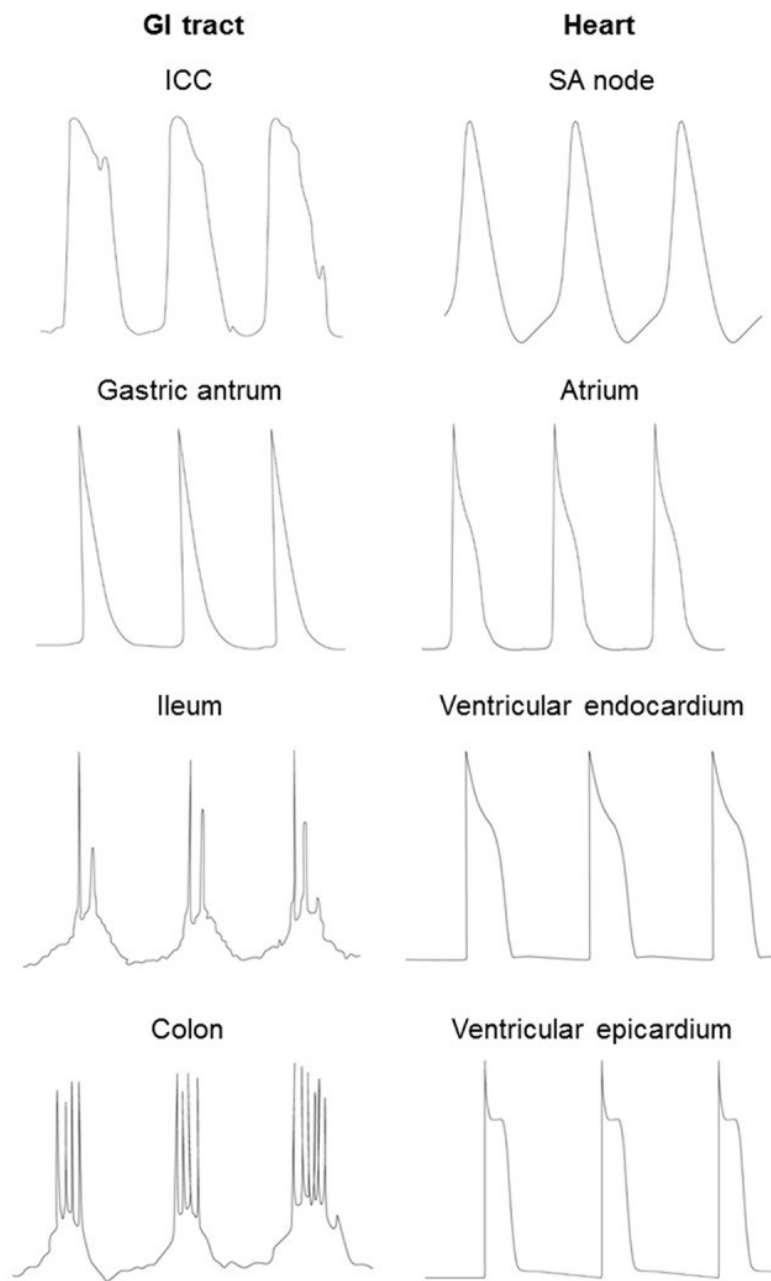
L'importance fonctionnelle des potentiels d'action de type à ondes lentes dans le tractus gastro-intestinal réside dans le fait qu'ils fournissent un mécanisme pour la génération d'activité contractile phasique, la régulation de la force des contractions, la détermination de la fréquence des contractions et la régulation de la direction de propagation des contractions (225). Les pics, se superposant à la phase de plateau de l'onde lente, fournissent un mécanisme supplémentaire pour la génération de la contraction, augmentant ainsi la force de contraction (225). Les potentiels d'action en pic génèrent une activité contractile. La force de contraction est liée à leur amplitude et à leur fréquence (225). La fréquence de contraction est déterminée par la fréquence de rafales de ces potentiels d'action (225).

Certaines similarités et différences entre les potentiels d'action cardiaque et gastro-intestinal peuvent être observées. Tout d'abord, le mécanisme moléculaire responsable de l'activité de stimulateur implique des processus dépendant de la tension et du  $Ca^{2+}$  dans les deux cas bien que les mécanismes soient un peu différents (227, 228). Dans le cœur, l'activation du muscle cardiaque déclenche un potentiel d'action, au cours duquel l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux  $Ca^{2+}$  de type L fournit le courant nécessaire pour la dépolarisation tubulaire transversale et la libération subséquente de  $Ca^{2+}$  induite par le  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (229). Par contraste, les cellules musculaires lisses du système gastro-intestinal reçoivent un courant dépolarisant direct des CICs pour activer les canaux  $Ca^{2+}$  de type L (230). Par ailleurs, les canaux  $Na^+$  trouvés dans CICs sont aussi codés par le gène *SCN5A* et présentent des propriétés



électrophysiologiques similaires à l'isoforme cardiaque (231). Toutefois, ces canaux sont susceptibles d'avoir un rôle dans la fixation du potentiel de membrane au repos et de moduler le taux de remontée et la fréquence des ondes lentes plutôt que de diriger la contribution au courant du stimulateur en soi (231). Les canaux HCNs, qui sont responsables du courant stimulateur et de l'activité stimulatrice du nœud sinusal, semblent également jouer un rôle dans les potentiels d'action gastro-intestinaux. Il a été démontré que les canaux HCNs, qui sont périodiquement activés par la production intracellulaire basale d'AMPc, sont présents dans les CICs du côlon et qu'ils régulent leur activité stimulatrice (232). De plus, une étude récente effectuée chez le poisson-zèbre a montré que l'expression de HCN4 joue un rôle important dans la régulation du péristaltisme rétrograde (mouvement vers l'extrémité orale), soit le type de péristaltisme impliqué dans le vomissement (233). Selon ce modèle, trois réseaux de neurones, qui contiennent des neurones exprimant HNC4, régulent l'initiation et la transmission des ondes migratoires ainsi que la contraction des muscles circulaires dans le péristaltisme rétrograde (233). Le premier réseau génère des vagues migrantes et forme le rythme (233). Le second propage des informations en activant le réseau neuronal oralement adjacent (233). Le troisième active les motoneurones locaux innervant les muscles circulaires (233). Or, l'expression de HCN4 au niveau de l'intestin a également été rapportée chez les mammifères (234). Il est donc possible qu'un mécanisme similaire, impliquant HCN4, existe chez ces derniers et n'ait pas encore été caractérisé (233). Au niveau de la forme des potentiels d'action, la génération des potentiels d'action cardiaque ou à ondes lentes dépend des conductances dépendantes de la tension et leurs durées sont déterminées par l'équilibre entre le courant entrant et sortant (Figure 17) (235). Dans le cœur, le potentiel d'action des cardiomyocytes est caractérisé par une ascension rapide suivie par un pic, une phase plateau et une repolarisation retardée vers le potentiel de membrane au repos (235). Dans les cellules du SAN, le courant stimulateur cause la dépolarisation spontanée avant la remontée du potentiel d'action (235). En revanche, au niveau du tractus gastro-intestinal, l'activité électrique produite par les cellules antrales gastriques a une morphologie triangulaire, avec un mouvement ascendant rapide suivi d'une repolarisation rapide (235). Les muscles lisses de l'intestin grêle et du côlon génèrent des ondes lentes, qui ont deux phases: une phase de dépolarisation initiale, le potentiel stimulateur, généré par les CICs-MY (236). La deuxième phase est produite par les CICs-IM dans le muscle lisse

(237). Certaines cellules sont aussi capables de produire des pointes régénératives médiées par le  $\text{Ca}^{2+}$  superposées à l'onde lente (238, 239).



**Figure 17. Forme des potentiels d'action cardiaques et gastro-intestinaux dans les différentes régions.** À gauche, régions de l'intestin. À droite, régions du coeur (235).

## **1.6 – Pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC)**

Des anomalies du SNE ou du réseau des CICs peuvent causer de nombreuses complications dont fait partie la pseudo-obstruction intestinale chronique. La pseudo-obstruction intestinale chronique est une maladie rare et nécessite un traitement à vie. Elle peut résulter de l'insuffisance des cellules stimulatrices (diminution de leur densité ou perte de fonction) et du système nerveux entérique à générer ou à propager des signaux électriques et à stimuler la contraction ultérieure des muscles lisses, conduisant à des défauts de contraction (POIC neurogénique) (240). Elle peut également résulter de défauts de contraction primitive des muscles lisses (POIC myogénique). Ceci fait en sorte que la transition du contenu luminal à travers l'intestin n'a pas lieu de façon efficace (241).

### **1.6.1 – Prévalence de la POIC**

La pseudo-obstruction intestinale chronique est l'une des plus importantes causes d'insuffisance intestinale autant chez les cas pédiatriques (15%) que chez les cas adultes (20%) (242, 243). Il semble que les femmes soient plus prédisposées d'en souffrir que les hommes (243-245).

### **1.6.2 – Étiologie de POIC**

La majorité des cas de POIC sont idiopathiques et résultent de facteurs multiples. Environ la moitié des cas de POIC résultent d'un large éventail de maladies (neurologiques, métaboliques/endocrines, paranéoplasiques, auto-immunes et infectieuses). L'accident vasculaire cérébral, l'encéphalite, la calcification des ganglions de base, l'hypotension orthostatique et le diabète peuvent affecter les voies nerveuses extrinsèques (sympathique/parasympathique) qui alimentent le système gastro-intestinal (242, 246, 247). D'autre part, le syndrome paranéoplasique, les infections virales, le diabète, la maladie de Hirschsprung, la maladie de Chagas et la maladie de Von Recklinghausen affectent le SNE intrinsèque et peuvent causer la POIC (242, 246, 247). La dystrophie myotonique et la sclérose systémique peuvent également causer la POIC en endommageant sélectivement les muscles lisses du SNE (242, 246, 247). Les maladies auto-immunes, le syndrome de Ehlers-Danlos, la

diverticulose jéjunale et l'entérite radique affectent non seulement les nerfs entériques, mais aussi les muscles lisses des intestins et possiblement les CICs (242, 246, 247). D'autres maladies comme l'hypoparathyroïdie et le phéochromocytome causent également la POIC, bien que les raisons restent peu connues (242, 246, 247). Certaines mutations autosomiques dominantes et récessives liées à l'X ont également été identifiées dans les gènes *FLNA* (filamine A), *ACTG2* (Actin, Gamma 2, Smooth Muscle, Enteric), *TYMP* (thymidine phosphorylase), *POLG1* (DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit) et *RAD21* (Sister Chromatid Cohesion 1) (248-252). Toutefois, la majorité des cas restent sporadiques et laissent les causes et les mécanismes pathologiques de POIC mal définis. Fait intéressant, il existe des maladies cardiaques liées à l'X, telles que la dysplasie cardiaque valvulaire liée à l'X qui résulte de mutations de *FLNA* et la cardiomyopathie dilatée liée à l'X (253-256). De nombreuses manifestations cliniques cardiaques et intestinales sont également trouvées dans d'autres syndromes liés à l'X, incluant certaines cohésinopathies (discutées plus en détails dans l'article de revue du Chapitre 3), suggérant l'existence de mécanismes partagés.

### **1.6.3 – Symptômes et diagnostic de POIC**

Les principaux symptômes de POIC sont des épisodes récurrents de douleurs abdominales, de distension abdominale, d'incapacité à déféquer et de vomissements lorsque l'obstruction a lieu dans une région plus distale de l'intestin alors que lorsque l'obstruction a lieu dans la partie supérieure de l'intestin, les patients atteints ont des problèmes digestifs, des nausées, des vomissements, de la diarrhée et perdent du poids (257). Les patients présentent également des problèmes du système urinaire, comme la méga cystite, l'hypo contractilité du détrusor (muscle lisse responsable de la vidange de la vessie) et la distension de la vessie, résultant généralement d'une neuromyopathie sous-jacente affectant l'intégrité des systèmes gastro-intestinal et urinaire (257, 258).

Le diagnostic de POIC peut être fait de différentes façons. Tout d'abord, il est possible de procéder par radiologie afin d'identifier s'il y a des évidences d'obstruction intestinale, comme des boucles dans l'intestin (257). Il est aussi possible de procéder par endoscopie (insertion d'une caméra dans le système digestif) afin d'exclure la possibilité d'obstructions mécaniques du petit intestin et du colon (259). Cette technique permet également d'exclure les faux positifs pouvant

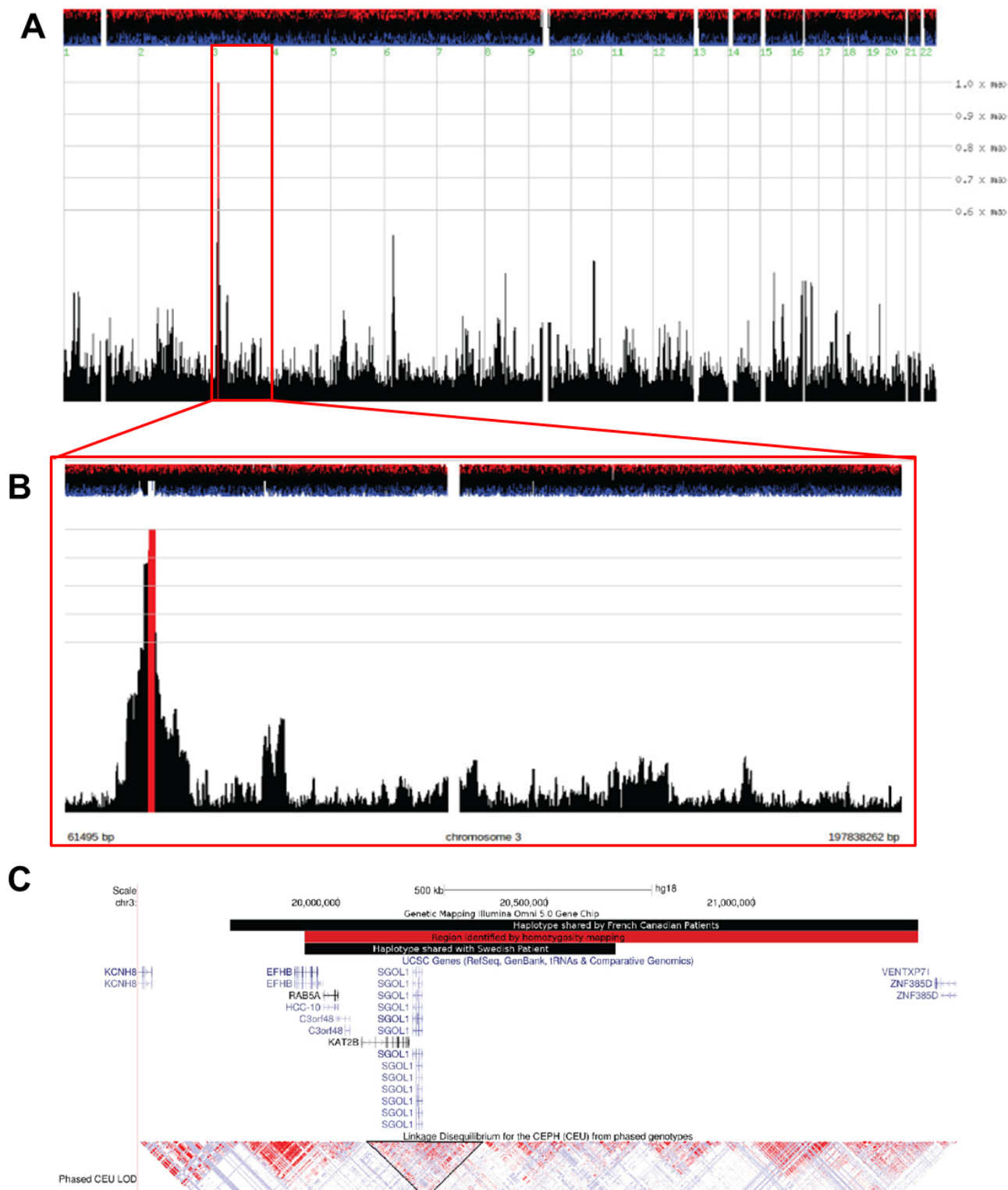
être obtenus par radiologie (259). De plus, la manométrie (méthode d'enregistrement de la pression dans le tube digestif) de l'intestin grêle est anormale chez les patients atteints de POIC, mais la faible spécificité de cette technique ne lui confère pas de valeur diagnostique (243).

#### **1.6.4 – Traitement de POIC**

Le traitement de la pseudo-obstruction intestinale chronique est très difficile et souvent, inefficace. Il est possible de traiter les phases aiguës d'obstruction par nutrition intraveineuse et par installation de tubes naso-gastriques ou rectaux afin d'assurer une décompression abdominale (257). L'administration d'érythromycine, de somatostatine et de néostigmine peut également être envisagée afin de diminuer la durée des phases d'obstruction aiguë (260). La chirurgie peut aussi être une option, mais puisque la majorité des cas de POIC touchent tout le système gastro-intestinal, peu de patients peuvent bénéficier de ce type de thérapie sans parler des effets secondaires de la chirurgie qui peuvent aggraver la détérioration (261). En effet, une mortalité subite a été observée chez une cohorte importante de patients pédiatriques atteints de POIC (262). De plus, aucun stimulateur intestinal artificiel n'existe à ce jour comme possible option thérapeutique. Au cours des dernières 50 années, de nombreuses recherches ont été faites afin de découvrir de nouvelles techniques de stimulation électrique gastrique. Une grande variété de stimuli électriques délivrés à la paroi gastrique d'animaux ou de patient souffrant de gastro-parésie ont été testés, mais restent insuffisants pour rétablir une activité électromécanique gastrique normale (263).

## 1.7 – Syndrome CAID

La pseudo-obstruction intestinale chronique a également été identifiée, par notre équipe, chez des patients atteints de maladie du nœud sinusal, donnant ainsi naissance à un tout nouveau syndrome d'arythmie généralisée nommé CAID (Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia). Étonnamment, ce syndrome résulte d'une mutation récessive du gène *SGOI* (K23E), un composant du complexe de la cohésine, et non d'une mutation au niveau d'un canal ionique ou d'un composant de la membrane tel qu'anticipé (1), ajoutant ainsi le syndrome CAID au spectre des cohésinopathies. Cette mutation modifie radicalement un acide aminé hautement conservé de l'exon 2 de *SGOI*, soit une lysine qui est remplacée par un acide glutamique. Cette mutation n'a pas été détectée dans 360 Canadiens-Français contrôles, et une seule fois dans 5377 contrôles d'ethnie mixte (hétérozygote). À ce jour, nous avons identifié 22 patients canadiens-français, un patient colombien, un patient norvégien et un patient suédois atteints de ce syndrome. Afin de définir l'origine de la mutation et d'exclure la présence de variantes du nombre de copies (CNVs), nous avons procédé au génotypage de 13 patients (incluant le patient suédois) et 3 membres de la famille non affectés. La cartographie d'homozygotie a identifié une seule région, sur le chromosome 3, qui définit un haplotype de 700 kb, commun à tous les patients CAID (Figure 18) (1). Il n'y a pas de variantes de nombre de copies dans cette région (1). De plus, nous avons constaté que l'haplotype lié à la maladie est identique par descendance entre les patients canadiens-français et le patient suédois, suggérant un effet fondateur transatlantique (1). Toutefois, la généalogie et les analyses génétiques ont exclu toute parenté directe entre l'individu suédois et les Canadiens-Français (1).



**Figure 18. Représentation graphique des scores d'homozygoties de 12 patients canadiens-français et du patient suédois. Au niveau du génome entier (A) et au niveau du**

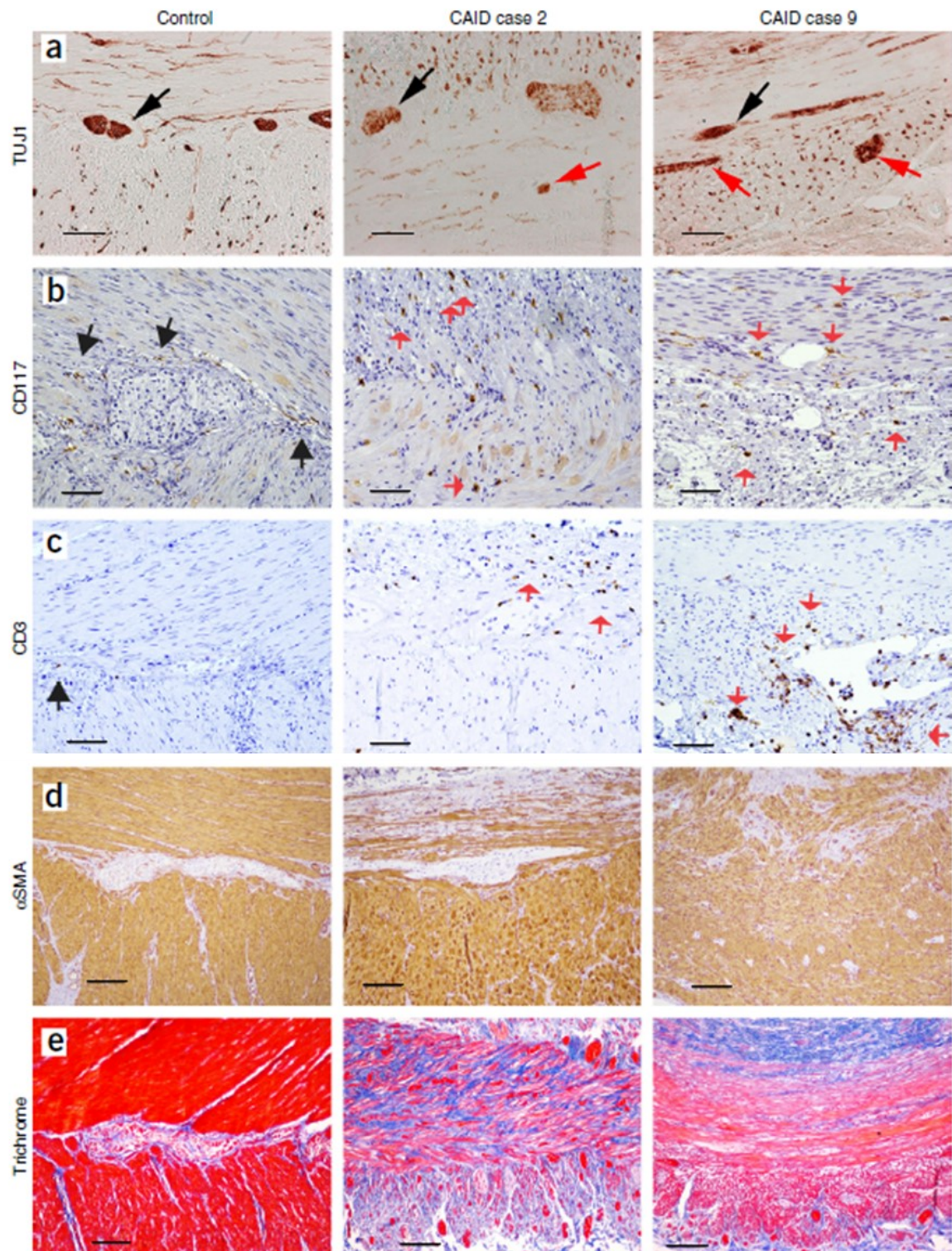
chromosome 3 **(B)**. Reconstruction graphique du chevauchement des haplotypes des patients canadiens-français et du patient suédois sur le navigateur UCSC (University of California Santa Cruz) **(C)** (1).

Une approche combinée de génotypage à haut débit et d'analyse généalogique a permis l'identification d'une ascendance commune aux patients CAID canadiens-français. Pour ce faire, la base de données BALSAC a été utilisée. Il s'agit d'une base de données qui regroupe les actes de l'état civil du Québec qui ont été reliés entre eux via une méthode de jumelage de données nominatives, permettant ainsi la reconstitution automatique des liens généalogiques de la population québécoise sur l'ensemble du territoire depuis le début de la colonisation jusqu'à aujourd'hui (264). Plus précisément, 64 ancêtres communs mariés au 17<sup>e</sup> siècle en France ou au Québec ont été identifiés pour 8 patients CAID (1). Cette analyse a également révélé que tous les cas de CAID proviennent de l'est du Québec et partagent un haplotype ancestral commun dont l'âge est estimé à  $13 \pm 4$  générations (1). De plus, la généalogie des patients CAID a permis l'identification d'un couple fondateur, marié en France en 1620, les liant tous entre eux (1). Finalement, le partage d'haplotype a permis d'identifier une ascendance commune, en Europe, à environ 30 générations (900 ans), entre les patients canadiens-français et le patient suédois (1). Toutes ces analyses supportent l'hypothèse d'un effet fondateur transatlantique lors de l'établissement de la Nouvelle-France au 17<sup>e</sup> siècle (1).

D'un point de vue pathologique, les personnes atteintes du syndrome CAID présentent des manifestations cliniques de la maladie du nœud sinusal ainsi qu'une pseudo-obstruction intestinale chronique, soit un phénotype très différent de ce qui est observé chez les autres cohésinopathies (1). Des anomalies valvulaires ont également été observées chez certains patients (41%). Le syndrome CAID semble également être une maladie à 2 volets, soit un volet acquis et un volet développemental. En effet, à la naissance, aucun patient ne présentait de pathologie, ce qui suggère que la pathologie de CAID s'acquiert avec le temps. L'âge médian du diagnostic cardiaque est de 15 ans (5-43 ans) alors que celui pour le diagnostic intestinal est de 14.5 ans (6-34 ans). De manière générale, les manifestations gastro-intestinales surviennent avant les manifestations cardiaques. De plus, les analyses histologiques effectuées sur les intestins des patients CAID confortent l'hypothèse que ce syndrome combine un volet acquis (destruction de l'architecture du muscle lisse, fibrose) et un volet développemental (ganglions



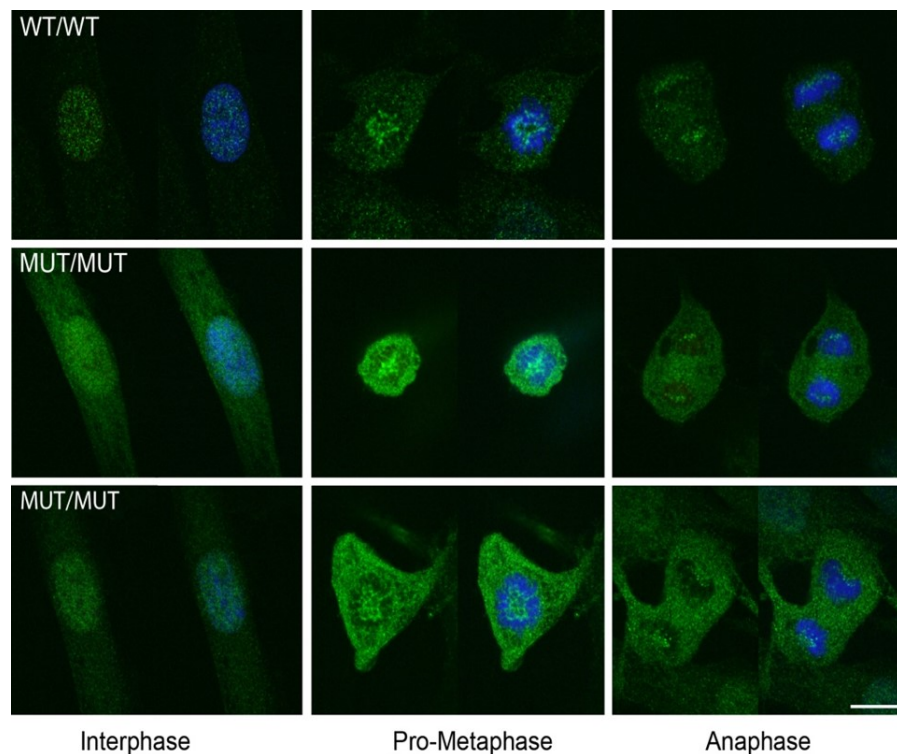
anormaux et mal localisés) (Figure 19) (1). Plus en détails, nous avons identifié des anomalies caractéristiques dans le SNE, qui contrôle les réflexes gastro-intestinaux (1). En effet, nous avons relevé la présence de ganglions hypoplasiques ainsi qu'une mauvaise localisation de ces derniers et des cellules interstitielles de Cajal dans les couches musculaires lisses circulaires et longitudinales (Figure 19A et B) (1). Une abondance de lymphocytes T dans les couches musculaires lisses intestinales a aussi été observée, ce qui est compatible avec l'activation accrue de la voie de signalisation TGF- $\beta$  observée en culture cellulaire (Figure 19C) (1). L'amincissement des couches musculaires lisses, la fragmentation de l'architecture des fibres musculaires lisses et une fibrose étendue ont été observés (Figure 19D et E) (1). Tout ceci suggère que le phénotype POIC observé chez les patients CAID résulte de dysfonctionnements au niveau des cellules interstitielles de Cajal et du système nerveux entérique.



**Figure 19. Histologie intestinale des patients CAID.** Marquage à la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) de (a) TUJ1 (Neuron-specific  $\beta$ III tubulin), un marqueur neuronal exprimé dans les cellules ganglionnaires intestinales. Les flèches noires indiquent les ganglions normaux et

les flèches rouges les ganglions mal localisés dans la couche musculaire lisse longitudinale. **(b)** CD117 (c-kit), un marqueur des cellules de Cajal. Les flèches noires indiquent la localisation normale des cellules de Cajal autour des ganglions et les flèches rouges, les cellules de Cajal localisées dans les couches musculaires lisses circulaires et longitudinales chez les patients CAID. **(c)** CD3 (Cluster of Differentiation 3), un marqueur des lymphocytes matures. Les flèches rouges indiquent une invasion des lymphocytes dans les couches musculaires lisses chez les patients CAID en comparaison aux lymphocytes chez le contrôle indiqué par la flèche noire. **(d)**  $\alpha$ SMA ( $\alpha$  Smooth Muscle Actin), un marqueur des cellules des muscles lisses qui permet la visualisation des deux couches de muscles lisses. On remarque une vacuolisation et une perturbation de l'architecture des fibres musculaires lisses chez les patients CAID. **(e)** Trichrome Masson. Rouge: Cellules. Bleu: Tissu connectif environnant (1). On remarque une destruction de l'architecture du muscle lisse et une fibrose étendue dans la paroi intestinale (1).

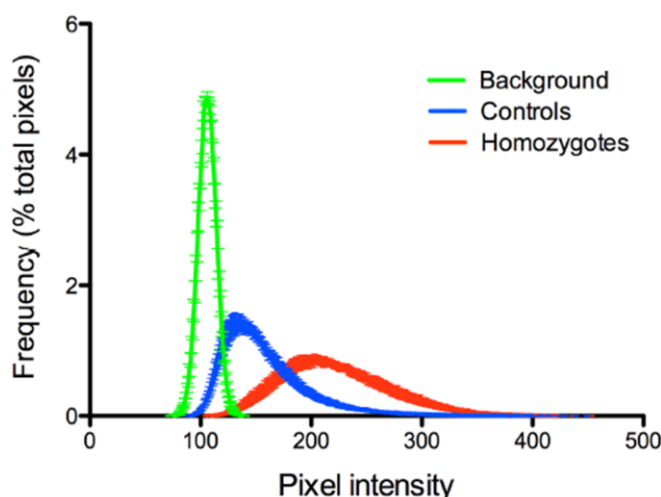
L'analyse de lignées cellulaires de fibroblastes de peau de patients CAID a montré que la mutation *SGO1* K23E cause une délocalisation cytosolique du patron d'expression de SGO1, et ce, à chaque étape du cycle cellulaire (Figure 20) (1).



**Figure 20. Analyse par microscopie confocale du patron d'expression de SGO1 pendant la mitose dans les fibroblastes de peau des patients CAID.** Comparaison d'un contrôle de type sauvage avec deux lignées cellulaires homozygotes pour la mutation *SGO1* K23E. La protéine SGO1 mutée se localise correctement dans la région centromérique au cours de la prémétaphase et de l'anaphase, mais présente un patron de localisation cytosolique anormal.

Panneau de gauche: Vert, marquage de SGO1. Panneau de droite : Vert et bleu, SGO1 et Hoechst. Scale bar, 10  $\mu$ m (1).

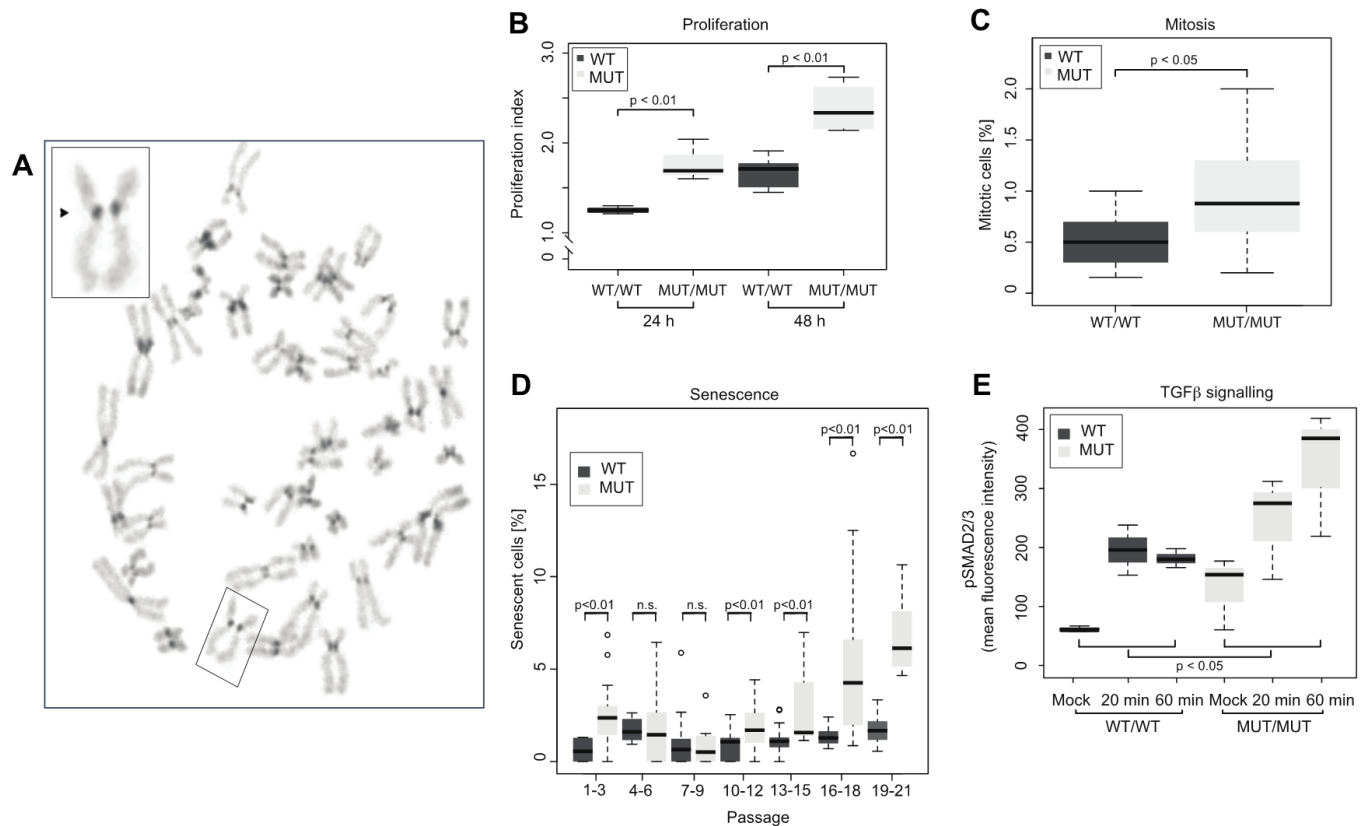
L'analyse quantitative de la distribution de l'intensité des pixels dans les noyaux montre une modification de l'organisation de SGO1 dans les fibroblastes des patients homozygotes par rapport aux contrôles. Chez les contrôles, la distribution se superpose partiellement à la région qui ne contient aucune cellule (fond, vert), reflétant ainsi des domaines nucléaires où le signal de SGO1 est négligeable parmi des domaines où l'intensité est plus élevée. Dans le noyau des patients, la distribution de l'intensité de SGO1 K23E ne se superpose pas au fond, indiquant que dans les fibroblastes provenant de 3 différents patients, le signal nucléaire SGO1 est délocalisé de façon reproductible par rapport aux 3 différents contrôles. Ceci est compatible avec le patron d'expression plus diffus observé (Figure 21) (1).



**Figure 21. Analyse quantitative de la microscopie confocale.** L'analyse quantitative de l'intensité des pixels de SGO1 dans le noyau a révélé une organisation altérée de SGO1 dans les fibroblastes des patients CAID (rouge) en comparaison aux contrôles (bleu). Les données représentent la moyenne  $\pm$  s.e.m. de 12 cellules provenant de 3 individus par génotype (1).

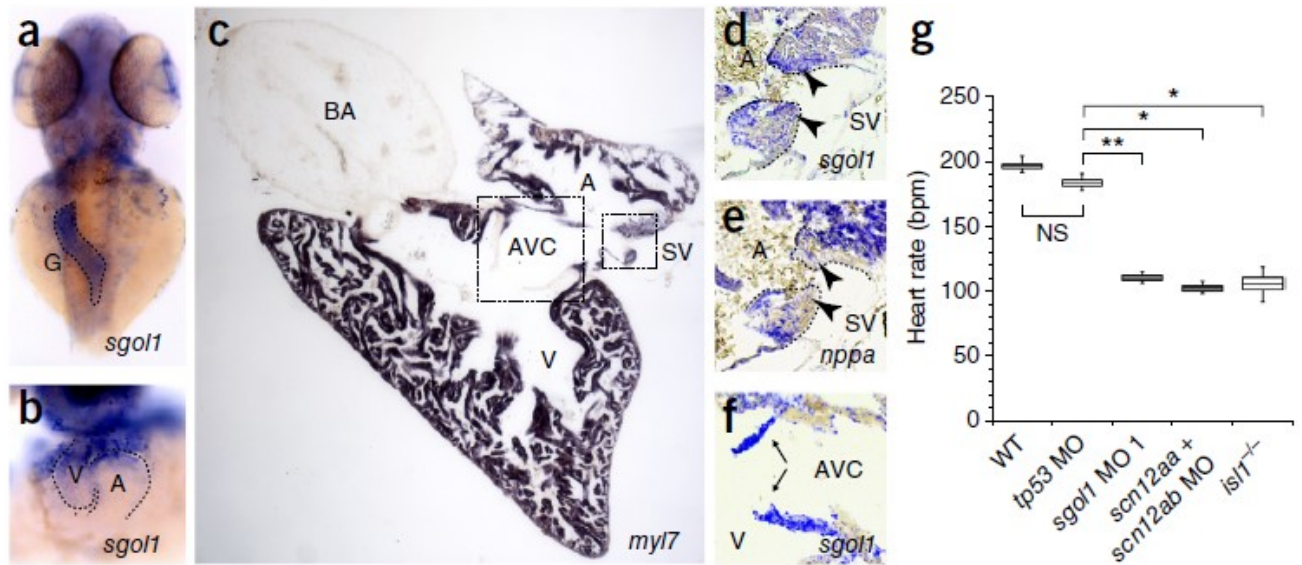
Les fibroblastes de patients CAID présentent également une accélération du cycle cellulaire, un défaut de cohésion centromérique, un plus haut taux de sénescence et une activation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  (Figure 22) (1).





**Figure 22. Phénotypes cellulaires du syndrome CAID.** Étalage chromosomique qui met en évidence un défaut de cohésion centromérique dans les fibroblastes des patients CAID (A). Indice de prolifération des fibroblastes CAID vs contrôles (B). Pourcentage de cellules en mitose des fibroblastes CAID vs contrôles (C). Pourcentage de cellules sénescents des fibroblastes CAID vs contrôles (D). Niveau de phosphorylation de SMAD2/3 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2/3), un effecteur en aval de la voie de signalisation TGF- $\beta$ , chez les fibroblastes CAID vs contrôles (E) (1).

D'autre part, l'inactivation de *sgo1* chez le poisson-zèbre reproduit les anomalies phénotypiques observées chez les patients atteints de CAID (Figure 23) (1).



**Figure 23. Expression spatiotemporelle et étude fonctionnelle de *sgo1* chez le poisson-zèbre.** Hybridation in situ de *sgo1* sur des embryons de poisson-zèbre de type sauvage (3 jours après la fécondation). Vue dorsale. On remarque l'expression de *sgo1* dans le bulbe intestinal et l'intestin (a). Vue ventrale. On remarque l'expression de *sgo1* dans le cœur embryonnaire (b). Marquage avec le marqueur myocardique *myl7* (Myosin Light Chain 7) (c). Les zones encadrées indiquent les régions agrandies indiquées en d à f. Expression de *sgo1* à la base des valves veineuses dans la région sinoauriculaire (d). Expression de *nppa* dans la région sinoauriculaire. Les pointes de flèche indiquent les cellules négatives pour *nppa* situées à la base des valves veineuses (e). Expression de *sgo1* dans les valves atrioventriculaires (f). Analyse de la fréquence cardiaque montrant que le KO de *sgo1* par morpholino diminue la fréquence cardiaque (g) (1).

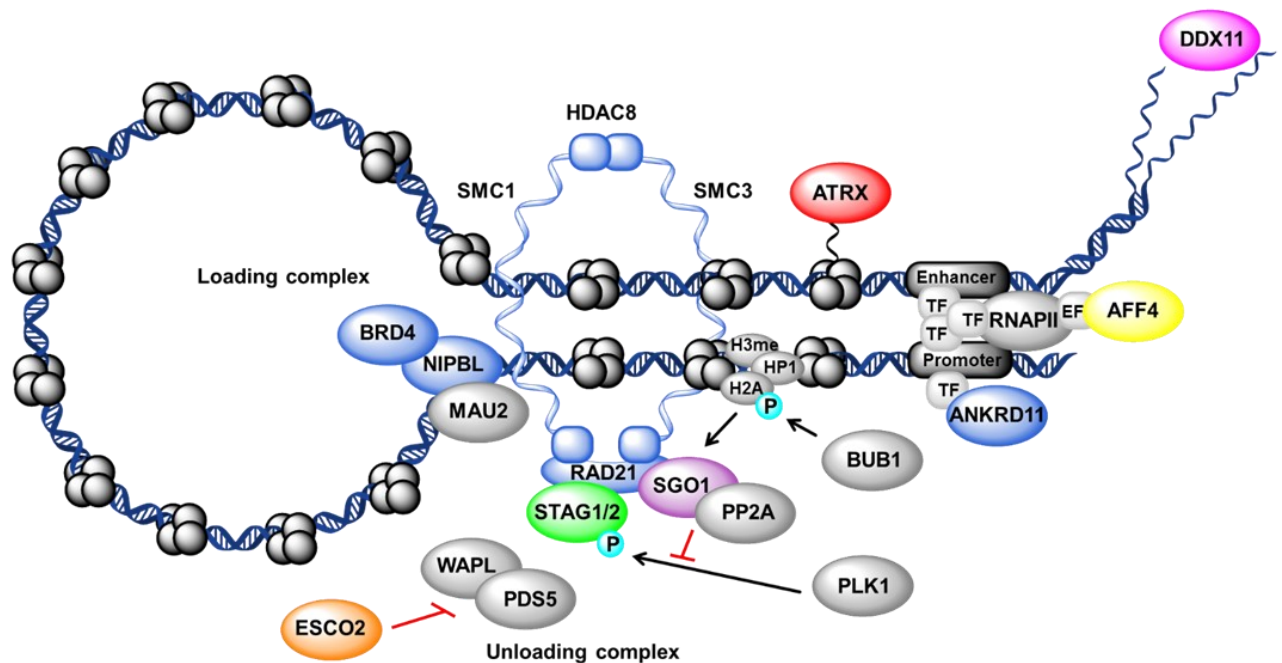
En considérant ceci, la possibilité que SGO1 et le complexe de la cohésine jouent un rôle non canonique dans le maintien de modules de transcription partagés du nœud sinusal dans le cœur et des cellules Cajal dans l'intestin est intéressante et suggère un rôle jusqu'ici insoupçonné de SGO1 dans l'intégrité des stimulateurs humains (1).

## **1.8 – Complexe de la cohésine et cohésinopathies**

Puisque le syndrome CAID résulte de la mutation de SGO1, un composant du complexe de la cohésine, il est important de définir ce complexe et ses fonctions afin de mieux comprendre les effets possibles de la mutation sur le phénotype observé chez les patients ainsi que de comparer ce syndrome aux autres maladies résultantes de mutations du complexe de la cohésine (cohésinopathies).

### **1.8.1 – Complexe de la cohésine**

Le complexe de la cohésine est constitué de 4 sous-unités : SMC1 et SMC3 (Structural Maintenance Of Chromosomes 1/3) (qui forment un hétérodimère), d'une klésine, RAD21 (REC8 (Recombination And Sister Chromatid Cohesion Protein Homolog) pour la méiose) et d'une protéine à domaine répété «HEAT», STAG (Stromal Antigen) (SA1/SA2 pour la mitose et SA3 pour la méiose) qui établissent la structure en anneau de la cohésine (265). Le chargement et le déchargement du complexe de la cohésine sur les chromosomes sont assurés par un mécanisme à «double porte» qui sera décrit en détails dans l'article de revue du Chapitre 3.



**Figure 24. Constituants (SMC1, SMC3, RAD21 et STAG) et partenaires du complexe de la cohésine.** Les couleurs indiquent les protéines mutées dans les cohésinopathies. Bleu: Syndrome de Cornelia de Lange (CdLS), mutations de *NIPBL* (Nipped-B-Like Protein NIPBL, Cohesin Loading Factor), *HDAC8*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *BRD4*, (Bromodomain Containing 4) et *ANKRD11* (Ankyrin Repeat Domain 11), Orange: Syndrome de Roberts (RBS), mutation de *ESCO2* (Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2), Rose: Syndrome de Warsaw-Breakage (WABS), mutation de *DDX11* (DEAD/H-Box Helicase 11), Rouge: Syndrome alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X, mutation d'*ATRX* (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked), Jaune: Syndrome cognitive impairment, coarse facies, heart defects, obesity, pulmonary involvement, short stature, and skeletal dysplasia (CHOPS), mutation d'*AFF4* (ALL1-Fused Family Member 4), Vert: Syndrome de déficience intellectuelle STAG2 liée à l'X, mutation de *STAG2* et violet: Syndrome CAID, mutation de *SGO1* (266).

### 1.8.2 – Rôle du complexe de la cohésine dans la régulation du cycle cellulaire

Le mouvement des chromatides sœurs pendant la mitose doit être très précisément régulé à travers les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, il est très important qu'elles restent en paires de la phase S jusqu'à la métaphase et qu'elles se séparent à l'anaphase (267). Pour ce faire, après la réplication, les chromatides sœurs sont retenues ensemble au niveau du centromère par le complexe de la cohésine qui forme une structure en forme d'anneau autour d'elles (268). Le mécanisme qui régit cette cohésion centromérique ainsi que celui impliqué dans



la libération des chromatides sœurs au cours de la mitose sera discuté plus en détails dans l'article de revue du Chapitre 3.

Au cours de la méiose, les chiasmatas (recombinaison homologue entre deux chromatides non-sœurs) sont maintenus par les complexes de la cohésine le long des bras de chromosomes des chromatides sœurs afin que les chromosomes homologues restent connectés (269). Ces complexes doivent donc être clivés par séparase pour permettre la ségrégation des chromosomes comme en mitose (269). Il en va de même au cours de la transition métaphase II/Anaphase II afin de permettre la ségrégation des chromatides (269).

### **1.8.3 – Rôles du complexe de la cohésine dans la régulation de la transcription**

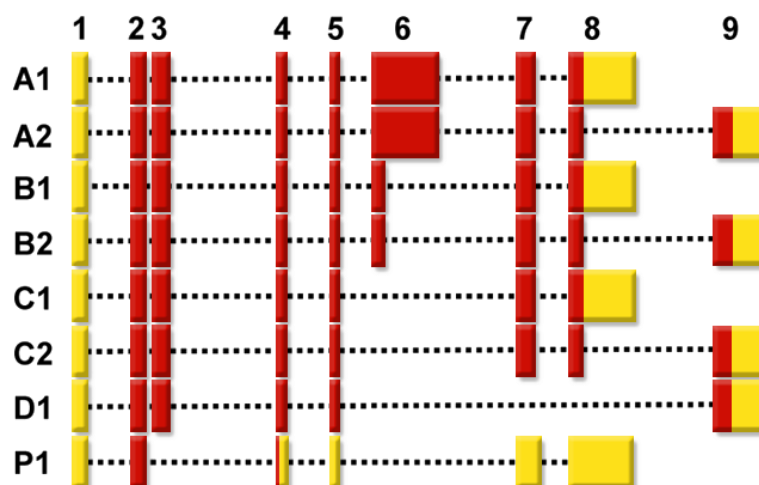
Plus récemment, une nouvelle fonction du complexe de la cohésine a été découverte dans la régulation de la transcription via la modulation de la structure de la chromatine (270). Les différents mécanismes impliqués dans cette régulation seront abordés dans le Chapitre 3.

### **1.8.4 – Cohésinopathies**

Les maladies résultantes de mutations au niveau des constituants du complexe de la cohésine sont en expansion et ont été regroupées sous une même bannière, les cohésinopathies, bien que ces dernières présentent des manifestations phénotypiques variées. Les cohésinopathies connues à ce jour sont le syndrome de Cornelia de Lange, le syndrome de Roberts, le syndrome de Warsaw Breakage, le syndrome alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X, le syndrome CHOPS, le syndrome de déficience intellectuelle STAG2 lié à l'X et le syndrome CAID découvert par le laboratoire du Dr Andelfinger. Chacun de ces syndromes sera discuté plus en détails dans l'article de revue du Chapitre 3 qui comprend également un tableau récapitulatif des manifestations cliniques associées à chacun.

## 1.9 – Caractérisation et rôles de SGO1

La caractérisation de l'expression et des rôles connus de SGO1 est aussi indispensable à la compréhension du syndrome CAID. Des études expérimentales faites chez la drosophile et la levure ont démontré l'existence d'une protéine impliquée dans la protection de la cohésine au niveau des centromères au cours de la mitose (271, 272). Cette protéine a été nommée shugoshin, ce qui signifie esprit gardien en japonais (271, 272). Shugoshin a été retrouvée chez presque tous les eucaryotes, mais sa fonction varie à travers les espèces (267). Chez certaines d'entre elles, un nombre différent de paralogues a été découvert (267). C'est le cas des vertébrés, où il existe deux protéines de la famille shugoshin, SGO1 et SGO2 (Shugoshin-2), où SGO1 est impliqué au niveau de la mitose et SGO2 au niveau de la méiose (273). Il existe également différentes isoformes de la protéine SGO1 chez l'humain, soit les isoformes A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 et P1 qui diffèrent principalement par la délétion, en totalité ou en partie, de l'exon 6 et/ou de l'exon 9 (Figure 29) (274).



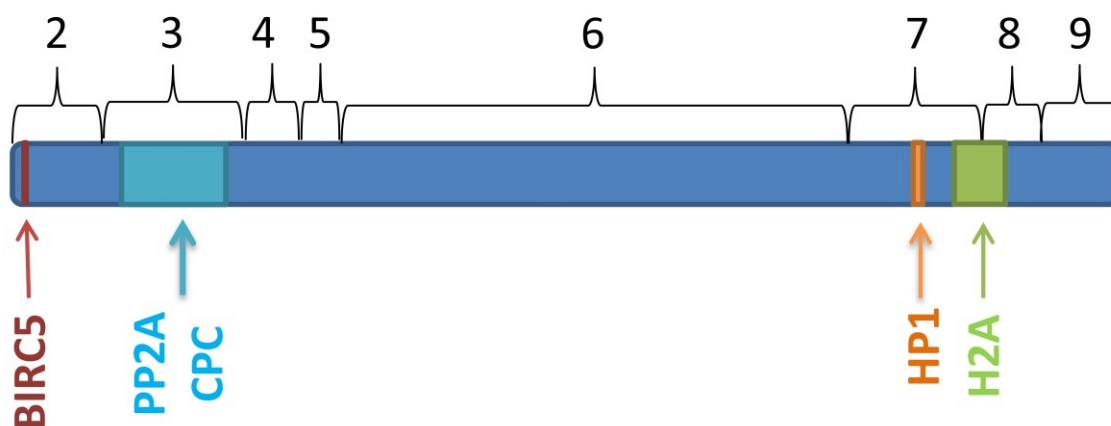
**Figure 25. Isoformes de SGO1.** Les cases rouges et jaunes indiquent les exons codants et les régions UTRs, respectivement (274).

Chez toutes les isoformes, l'exon 1 est non codant. Les isoformes A2 et C2 se localisent au niveau des centrosomes alors que les isoformes A1 et C1 se localisent au niveau des centromères pour protéger la cohésion centromérique (275). Il a été démontré que la localisation au centrosome dépend d'un petit peptide localisé en C-terminal et codé par l'exon 9 (275).

Toutefois, l'interacteur centrosomique est inconnu (275). La localisation et la fonction des autres isoformes de SGO1 sont peu définies.

### 1.9.1 – Interactions protéine-protéine de SGO1

SGO1 possède plusieurs sites d'interaction avec des protéines spécifiques, incluant PP2A (Protein Phosphatase 2), le complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) et BIRC5 (Baculoviral IAP Repeat Containing 5) en N-terminal ainsi que HP1 (Heterochromatin protein 1) et H2A (Histone H2A) en C-terminal (Figure 30).



**Figure 26. Représentation schématique de l'isoforme A2.** Les principaux interacteurs de SGO1 ainsi que leur sites d'interaction sont indiqués (266).

La détermination de la structure du complexe entre PP2A et SGO1 a été déterminée par rayons X et a révélé que les résidus 51 à 96 de SGO1 sont essentiels pour la liaison de PP2A. Plus spécifiquement, ces résidus forment une structure hélicoïdale qui est requise pour la liaison à PP2A (276). De plus, l'interaction des sous-unités régulatrice et catalytique de PP2A avec SGO1 dépend de l'homodimérisation préalable de SGO1, afin de former une structure d'homodimères hélicoïdaux parallèles (276). Cette structure hélicoïdale est aussi requise pour l'interaction avec le complexe CPC (277). SGO1 peut également former un complexe avec SET (Protein Phosphatase Type 2A Inhibitor), un inhibiteur de PP2A. Ce complexe se caractérise par la présence de 7 liaisons transversales interprotéines, incluant un site au niveau de la lysine K23, soit la même lysine qui est mutée dans le syndrome CAID (Figure 31) (278). La distribution de ces liaisons transversales suggère un arrangement antiparallèle qui révèle une série de résidus hydrophobes similaires aux interactions hydrophobes intervenant dans la



domaine «chromo shadow» (CSD) qui interagit avec les motifs PXVXL/I (279). Or, SGO1 possède 2 de ses motifs (P1 et P2) (Figure 32) (279). Cependant, seul le motif P1 est nécessaire à la liaison de HP1 (279). La formation du complexe HP1/SGO1 requiert également que HP1 soit sous forme homodimérique de telle sorte que chaque domaine «chromo shadow» interagit avec le motif (279).

Hs Sgo1 444 I T N V S L Y P V V K I R R L S L S P K K N K A S P A V A L P K R R C T A S 4  
Mm Sgo1 434 V T N I L Q C P R V K I R K P S L P P K R R E D S P A V A L T K R R C S T I 4  
Rn Sgo1 438 V T N S L R R P I V K S R K L S L A P K R H E D S P A V S L - - R R C T T I 4



SGO1 possède également au début de sa région N-terminal un motif Ala-Arg-Thr3ph-Lys qui est un déterminant spécifique pour la liaison au domaine BIRC5 de Survivine (280). La fonction des différentes interactions protéines-protéines décrites ci-dessus sera explorée en détails aux sections 1.9.3 et 1.9.4.

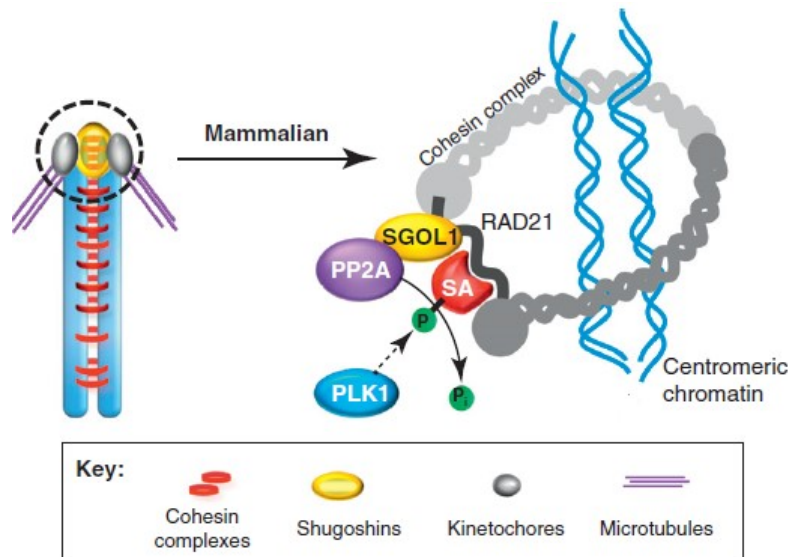
63

### **1.9.2 – Rôles de SGO1 dans le maintien de la cohésion au cours de la mitose**

Des études effectuées chez les levures ont mis en évidence la fonction initiale des protéines de la famille shugoshin, soit de protéger le complexe de cohésine centromérique au cours de la méiose et que le rôle de SGO1 dans la protection de ce complexe dans la mitose a été acquis chez les vertébrés (267). Chez l'humain, la déplétion de SGO1 pendant la mitose cause une perte prématurée de la cohésion centromérique, une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs et l'arrêt de la mitose, confirmant ainsi le rôle identifié précédemment chez la levure (273, 281, 282). De plus, le knockout homozygote de SGO1 chez la souris est létal, indiquant de ce fait que cette protéine est essentielle au développement des mammifères (283). Cependant, aucun phénotype compatible avec une dysfonction de la mitose n'a été retrouvé chez les patients CAID.

### **1.9.3 – Mécanisme moléculaire de la protection des complexes de cohésion centromérique par SGO1 et SGO2**

Au cours de la mitose chez les vertébrés, la cohésine est enlevée par un mécanisme en deux étapes. Pour assurer le bon fonctionnement de ce mécanisme, les complexes centromériques de la cohésine doivent être protégés durant la prophase (267). Chez les mammifères, SGO1 recrute PP2A aux centromères pour contrecarrer la phosphorylation du complexe de la cohésine au niveau des sous-unités SA1/2 par PLK1 (Polo Like Kinase 1) afin de protéger la cohésion centromérique dans les cellules mitotiques en prophase (Figure 33) (267). Pour ce qui est de la méiose I, SGO2 recrute PP2A au centromère pour empêcher la phosphorylation de REC8 par une kinase qui n'est pas connue à ce jour, ce qui protège la cohésion centromérique du clivage par Séparase (267).

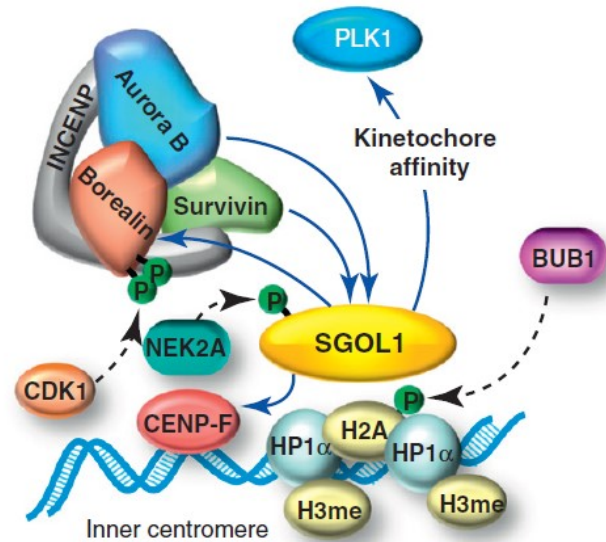


**Figure 29. Mécanisme moléculaire de la protection du complexe de cohésion centromérique par SGO1 au cours de la mitose chez les mammifères. (Adapté de (267)).**

#### **1.9.4 – Localisation centromérique de SGO1 via la régulation des complexes CPC et SAC (spindle assembly checkpoint)**

Au cours de la mitose, la ségrégation adéquate des chromosomes requiert l'attachement des kinétochores des chromatides sœurs aux microtubules du fuseau mitotique provenant des pôles opposés de la cellule afin de générer la tension entre les centromères (284). Ce processus est régulé par l'interaction de SGO1 avec les complexes CPC et SAC (267). Le complexe CPC est constitué de la kinase Aurora B et de plusieurs composants régulateurs, soit INCENP (Inner Centromere Protein), Survivine et Borealine (285). Ce complexe est responsable de la localisation de SGO1 aux centromères au cours de la mitose (285). Tout d'abord, la localisation centromérique de SGO1 dépend de la présence de HP1 $\alpha$ -H3K9me3 et de la phosphorylation de l'histone H2A par BUB1 (Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 Homolog) une kinase du complexe SAC (Figure 34) (286). Ensuite, la localisation de SGO1 dépend aussi de la kinase Aurora B (287). Le recrutement de cette dernière est assuré par la phosphorylation de Borealin par CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1) qui promeut la localisation centromérique du complexe CPC (288). De plus, il a été démontré que la région N-terminale de SGO1 peut imiter la région N-terminale phosphorylée de l'histone H3 qui est reconnue par le domaine Bir1 de Survivine (280). Par conséquent, SGO1 et l'histone H3 sont en compétition pour la liaison de Survivine, ce qui permet la régulation du recrutement du complexe CPC aux centromères (280). SGO1

régule également la liaison de PLK1, une kinase impliquée dans la transduction de la réponse à la tension, et de CENP-F (Centromere Protein F), une protéine requise pour les interactions entre les microtubules et les kinétochores ainsi que pour les points de contrôles du fuseau mitotique (273, 289, 290). Finalement, la phosphorylation de SGO1 par NEK2A (NIMA Related Kinase 2) est essentielle pour l'attachement adéquat des microtubules du fuseau mitotique aux kinétochores (291).



**Figure 30. Localisation de *SGO1* aux centromères. Cette localisation dépend de son interaction avec plusieurs facteurs.** (Adapté de (267)).

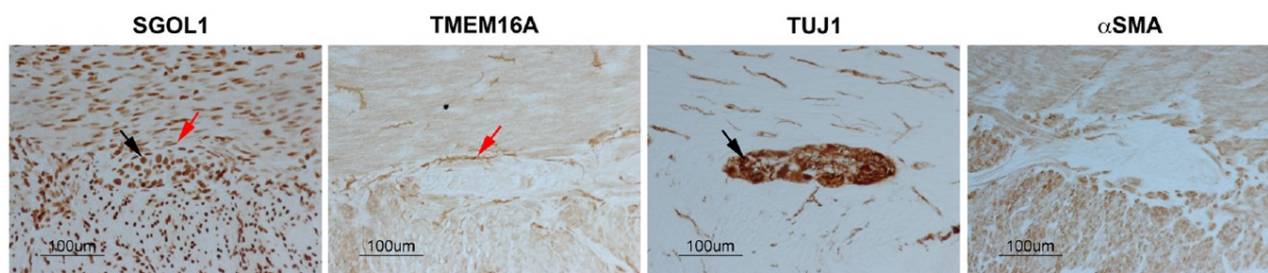
### 1.9.5 – Autres rôles de SGO1

Des études récentes ont montré que SGO1 n'est pas seulement impliqué dans la protection du complexe de la cohésine, mais aussi dans la détection de la tension afin de permettre l'attachement des microtubules aux kinétochores au cours de la mitose (281). En effet, SGO1 retarde l'activation du complexe APC (Anaphase Promoting Complex) lorsque la tension est insuffisante dans les connexions entre les microtubules et les kinétochores (292). De plus, SGO1 joue un rôle essentiel dans la protection de la cohésion des centrioles, qui est régulé partiellement par PLK1 (293).



### 1.9.6 – Caractérisation de l'expression de SGO1

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire ont montré que dans les tissus normaux, SGO1 est exprimé de manière omniprésente dans la paroi intestinale, y compris dans les muscles lisses et le SNE (Figure 35) (1). L'expression de SGO1 dans la paroi intestinale est très forte au niveau des cellules neuronales entériques et cellules interstitielles de Cajal alors qu'elle est moindre dans les cellules musculaires lisses (Figure 35) (1).



**Figure 31. Patron d'expression de SGO1 dans le colon humain normal.** L'immunohistochimie montre une forte expression de SGO1 dans les cellules entériques neuronales (flèches noires) et dans le réseau de cellules interstitielles de Cajal (flèches rouges). SGO1 est également exprimé dans une moindre mesure dans les cellules musculaires lisses. TMEM16A est un canal calcique exprimé dans le réseau de cellules interstitielles de Cajal, TUJ1 est un marqueur neuronal exprimé dans les cellules ganglionnaires intestinales et  $\alpha$ -SMA est un marqueur des muscles lisses (1).

La caractérisation d'un modèle de souris  $Sgo1^{+/LacZ}$  a été également faite au sein de notre laboratoire. Dans ce modèle, la cassette LacZ a été insérée entre les exons 4 et 5 de *Sgo1* (Figure 36) (294).

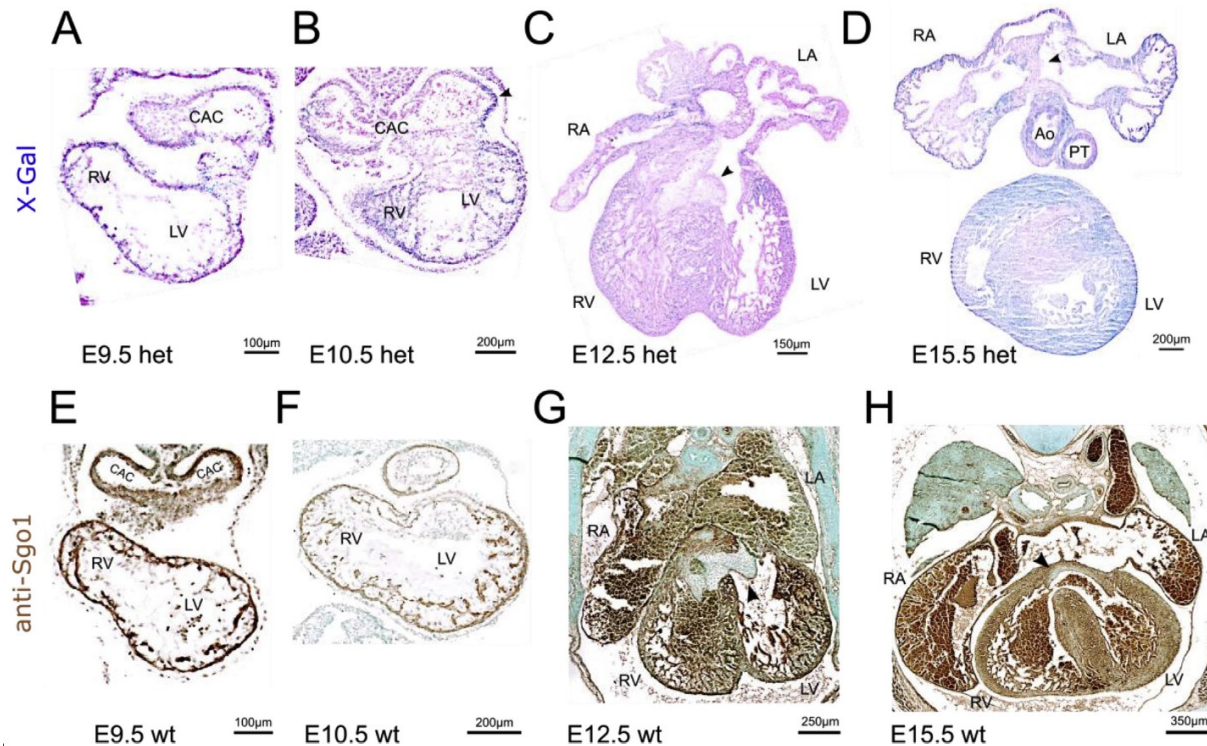


**Figure 32. Carte allélique de la souris  $Sgo1^{+/LacZ}$ .** LacZ: gène de la  $\beta$ -galactosidase, SA: accepteur d'épissage, pA: séquence de polyadénylation. FRT: cible de reconnaissance de la flippase, néo: gène de résistance à la néomycine (294).

De ce fait, l'expression de LacZ est sous le contrôle du locus endogène, ce qui permet d'étudier l'expression de SGO1 par marquage au X-gal. Ce modèle de souris contient également

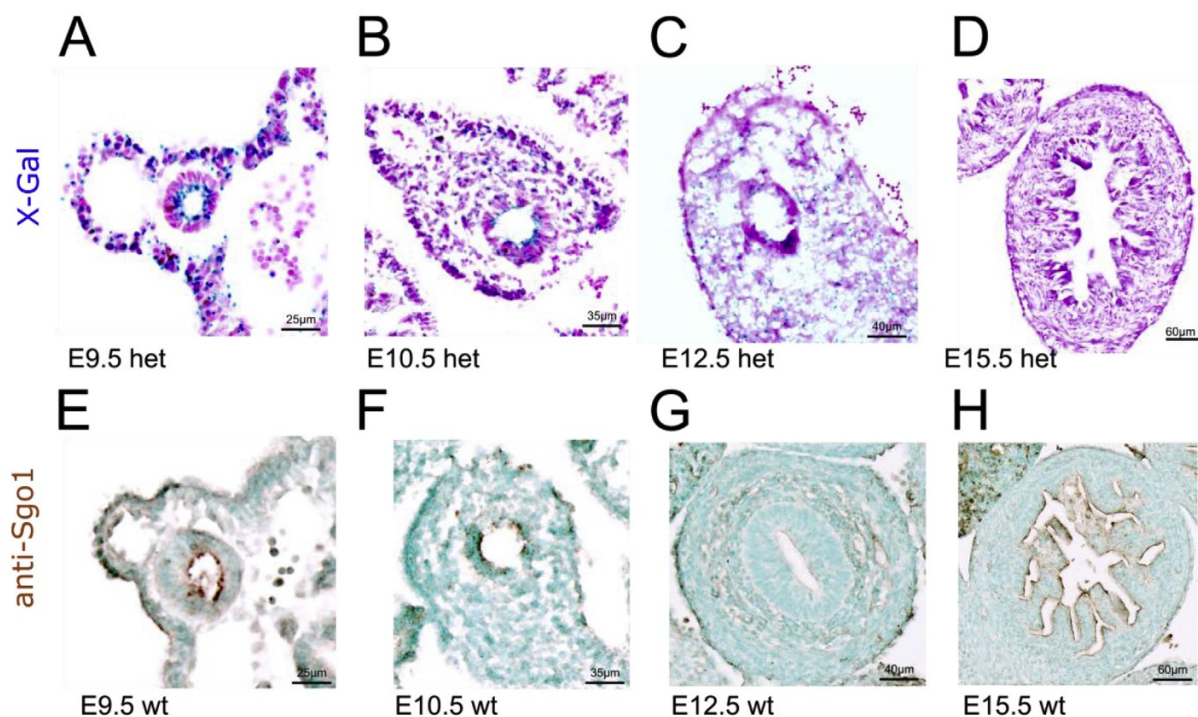


des éléments multicistroniques flanquant la séquence LacZ permettant la traduction de 2 produits, soit une version tronquée de la région N-terminale de SGO1 et la  $\beta$ -galactosidase (294). L'analyse de ce modèle de souris a montré une forte expression de SGO1 dans le cœur en développement (E9.5 à E15.5) (Figure 37) (295).



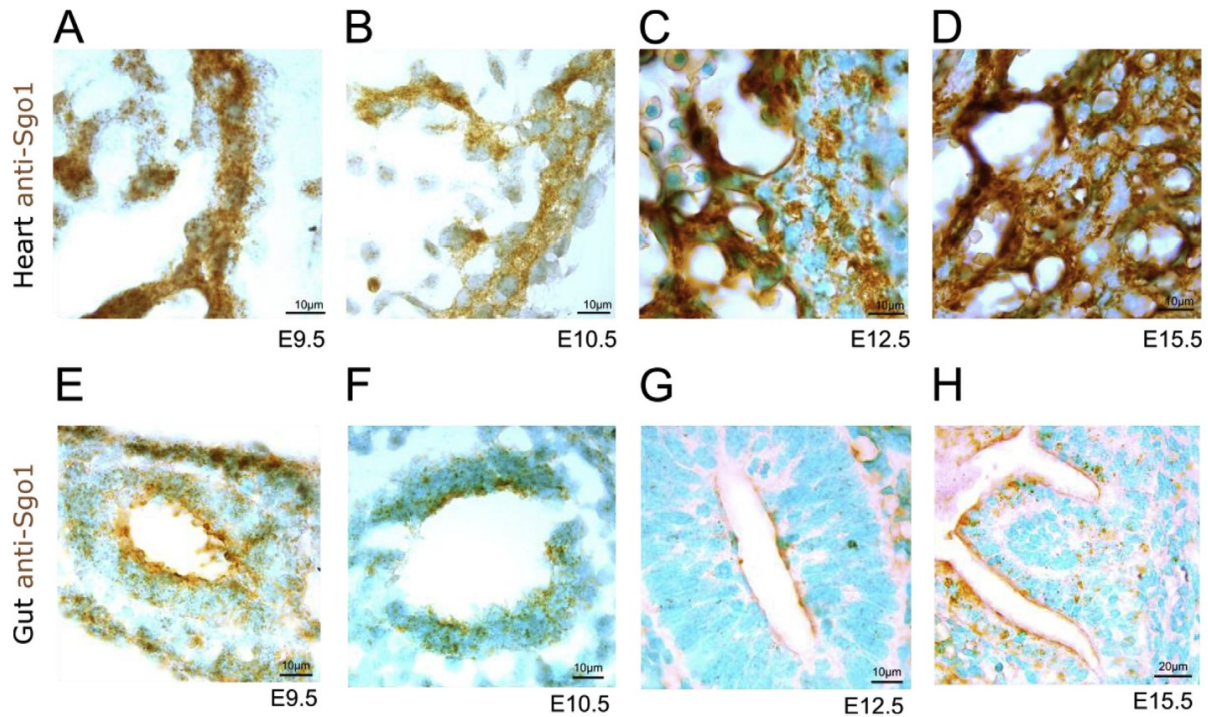
**Figure 33. Patron d'expression de SGO1 dans le cœur en développement du modèle murin  $Sgo1^{+/LacZ}$ .** Marquage au X-gal (A à D) et contre coloration au «nuclear fast red» (A à D). Marquage à la DAB et contre coloration au vert de méthyle. (E à H). L'expression de SGO1 est omniprésente dans le cœur à E9.5 (A et E). À E10.5, l'expression de SGO1 est élevée dans les chambres cardiaques en formation (B et F). L'expression de SGO1 est élevée dans les ventricules et les oreillettes, mais absente du coussin cardiaque (flèche noire) à E12.5 (C et G). L'expression de SGO1 est élevée partout dans le cœur, à l'exception du coussin cardiaque (flèche noire) à E15.5 (D et H) (295).

La caractérisation de ce modèle de souris a montré une forte expression de SGO1 dans l'intestin en développement (E9.5 à E15.5) (Figure 38) (295).



**Figure 34. Patron d'expression de SGO1 dans l'intestin en développement du modèle murin *Sgo1*<sup>+/LacZ</sup>.** Marquage au X-gal et contre coloration au «nuclear fast red» (A à D). SGO1 est exprimé dans les cellules épithéliales tout au long du développement (E9.5 à E15.5) et plus particulièrement au début du développement. On remarque également l'expression de SGO1 dans certaines cellules de la couche mésenchymateuse. Marquage à la DAB et contre coloration au vert de méthyle (E à H). Le patron d'expression de SGO1 au niveau de la couche épithéliale et du mésenchyme lors de l'immunocoloration à la DAB est plus faible en intensité dans la couche viscérale, mais compatible avec les résultats de coloration X-gal (295).

De plus, on remarque un patron d'expression extranucléaire de SGO1 dans le cœur et l'intestin en développement, ce qui concorde avec la délocalisation cytosolique du patron d'expression de SGO1 chez les fibroblastes de peau de patients CAID (Figure 39) (295).



**Figure 35. Grossissement du marquage à la DAB du ventricule gauche avec la chambre face au côté gauche (A-D) et de l'épithélium du tube intestinal (E-H).** À E9.5, seulement quelques cellules présentent un patron d'expression nucléaire dans les cellules cardiaques (A). Le patron d'expression de SGO1 est extérieur à la coloration nucléaire au vert de méthyle de E10.5 à E15.5 (B à D). SGO1 est exprimé dans la région apicale des cellules épithéliales de E9.5 à E15.5 (E à H). Plus le développement avance, plus le patron d'expression de SGO1 est distinct du marquage nucléaire au vert de méthyle (295).

La forte expression de SGO1 dans les organes ciblés par le syndrome CAID vient supporter l'hypothèse d'un rôle non canonique de SGO1 dans la pathophysiologie de CAID bien que le patron d'expression de SGO1 au cours du développement soit bien plus ubiquitaire que le suggère l'atteinte spécifique des stimulateurs observés chez les patients (295).



## 1.10 - La voie de signalisation TGF- $\beta$

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire ont soulevé l'implication de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans la pathophysiologie du syndrome CAID (section 1.7), bien que le mécanisme en cause et le lien entre cette voie de signalisation et le complexe de la cohésine dans un contexte pathologique soit inconnu. La voie signalisation TGF- $\beta$  est impliquée dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires, incluant la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette, l'adhésion, migration et l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs (296, 297). Pour ce faire, cette voie de signalisation peut être activée par plusieurs ligands différents qui engendreront des réponses spécifiques, mais ici, l'emphase sera mise sur TGF- $\beta$  seulement (Figure 40) (298, 299).

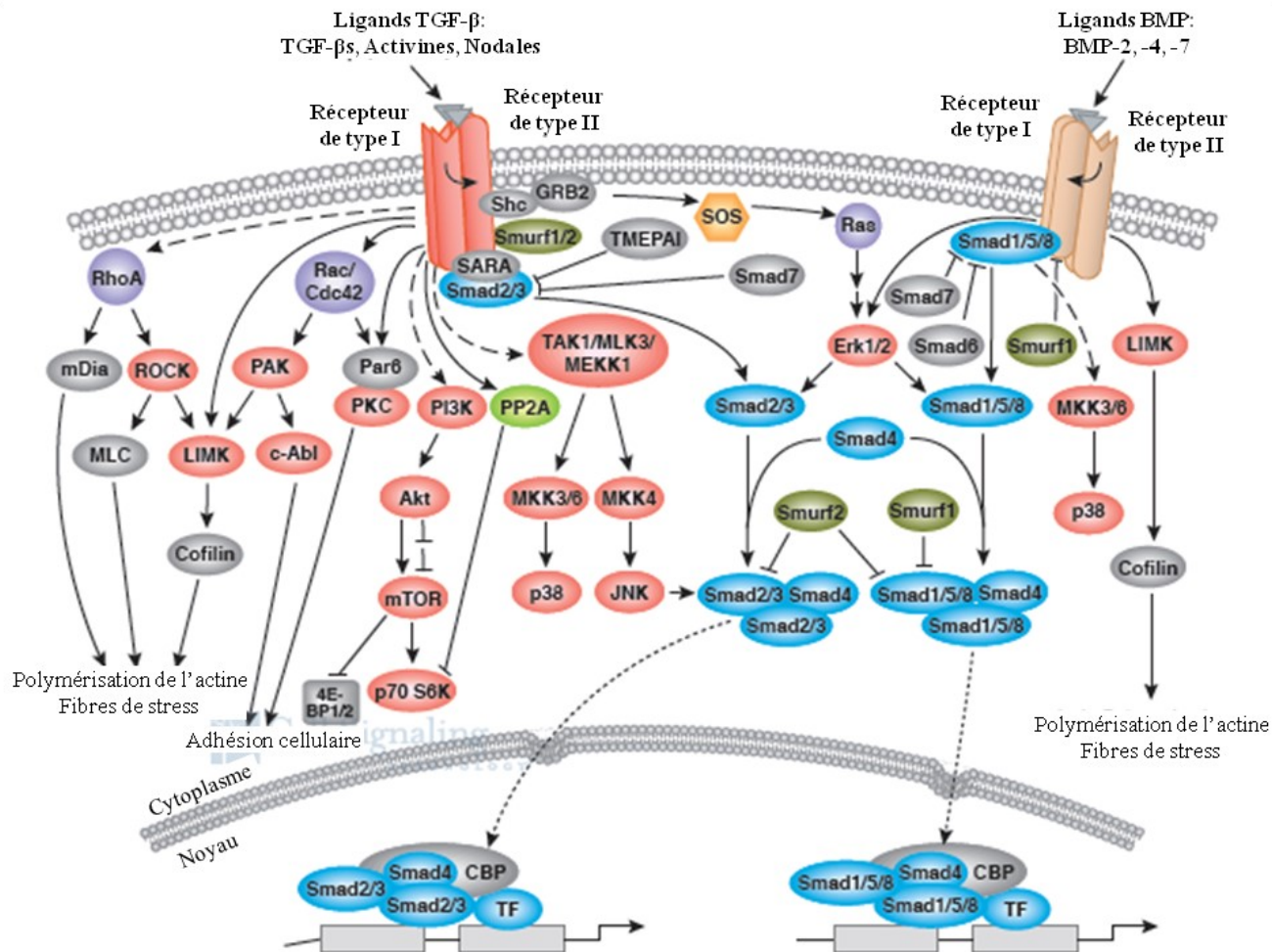


Figure 36. Voie de signalisation TGF- $\beta$ . (Adapté de (299)).

TGF- $\beta$  active les récepteurs de type I et II sont des récepteurs sérine/thréonine kinase qui forment des complexes hétéromériques (2 récepteurs de type I et 2 récepteurs de type II) (300). Une fois activés, ces complexes permettent d'amorcer la voie de signalisation TGF- $\beta$ . Cette dernière se subdivise en deux voies : la voie canonique, qui dépend des SMADs, et la voie non canonique qui est SMADs indépendante.

### **1.10.1 – Voie canonique de la signalisation TGF- $\beta$**

La voie canonique de la signalisation TGF- $\beta$  dépend des protéines SMADs. L'activation du complexe hétéromérique par TGF- $\beta$  engendre la phosphorylation de SMAD2 et 3 (300, 301). Pour ce faire, TGF- $\beta$  se lie au niveau du récepteur de type II (302). Ce dernier phosphoryle ensuite les récepteurs de type I afin d'activer son activité kinase (302, 303). Le récepteur de type I phosphoryle à son tour les SMADs sur deux résidus sérine dans leur région C-terminale. Cette phosphorylation est favorisée par la protéine d'échafaudage SARA (Smad anchor for receptor activation). La phosphorylation de SMAD2/3 permet le recrutement de SMAD4 (304). Le complexe SMAD2/3/4 est transloqué au noyau via les nucléopores et se lie aux sites SBE (SMAD Binding Element) de l'ADN grâce au motif CAGAC afin de réguler l'expression génique (305, 306). La voie canonique est inhibée par SMAD6 et 7 (307, 308). En effet, SMAD7 compétitionne avec SMAD2/3 pour la liaison au récepteur de type I, inhibant ainsi la voie canonique au profit de la voie non canonique (308).

### **1.10.2 – Voie non canonique de la signalisation TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  peut également induire l'activation de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) indépendamment des SMADs. Pour ce faire, TGF- $\beta$  phosphoryle les résidus tyrosine sur les récepteurs de type I et II ainsi que sur la SHC (SH2 Domain Protein C1) (309). Ceci permettra le recrutement du complexe GRB2/SOS (Growth Factor Receptor Bound Protein 2/ Son Of Sevenless Homolog 1) au niveau de la membrane plasmique (309). SOS active ensuite Ras en catalysant l'échange de GDP (guanosine diphosphate) pour du GTP (guanosine triphosphate). Ras ainsi activé se lie à Raf (Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), ce qui permet l'activation de la cascade MAPK incluant MEK1/2 (MAPK kinase Extracellular signal regulated Kinase) et ERK1/2 (Mitogen-Activated Protein Kinase) (309). L'activation des ERKs

permet de réguler la transcription de gènes cibles conjointement avec les SMADs pour contrôler l'endoMT (310, 311). Les ERKs peuvent également inactiver les R-SMADs par phosphorylation (312-314). TGF- $\beta$  régule aussi l'activation des voies de signalisation JNK (C-Jun N-Terminal Kinase) et p38 (p38 MAP Kinase) indépendamment des SMADs. Ainsi, les récepteurs TGF- $\beta$  interagissent avec TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) afin d'induire la formation de chaînes poly-ubiquitinées liées à K63 sur TRAF6 (315). TRAF6 poly-ubiquitiné recrute TAK1 (TGF-Beta-Activated Kinase 1) pour activer les voies JNK et p38 via MKK3/6 et MKK4 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) (316). Ces derniers peuvent également être activés par MEKK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase) et MLK3 (Mixed-lineage kinase 3) (317-319). Les voies JNK et p38 activées agissent conjointement avec les SMADs pour réguler l'apoptose et l'endoMT en contrôlant l'activité des facteurs de transcription en aval (320). JNK peut également réguler l'activité des R-SMADs par phosphorylation directe (320).

### 1.10.3 – Manifestations cliniques associées à la signalisation TGF- $\beta$

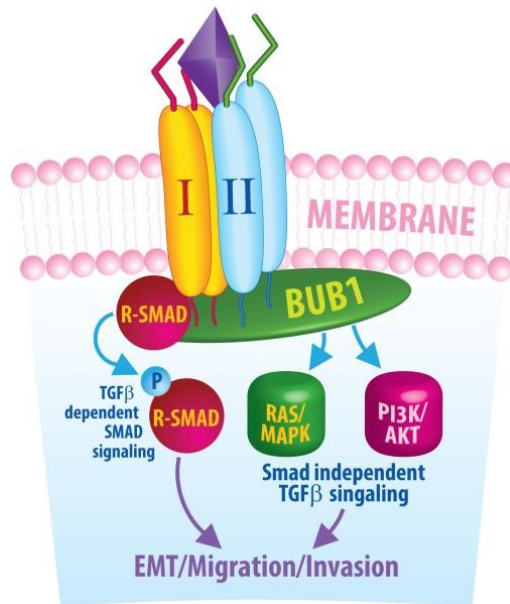
La dérégulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  est connue comme étant impliquée dans les cancers, les maladies cardiovasculaires, les fibroses ainsi que dans les maladies du squelette. En effet, des mutations sporadiques des constituants de la voie de signalisation TGF- $\beta$  ont été identifiées dans plusieurs cancers incluant le cancer colorectal, pancréatique, du sein et du poumon (321). Au niveau cardiovasculaire, des mutations héréditaires ou sporadiques de la voie ont été identifiées comme impliquées dans certaines maladies comme la télangiectasie hémorragique héréditaire (*ALK1*), l'hypertension pulmonaire primitive (*BMPR2* (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2)), le syndrome de Loeys-Dietz (LDS) (*TGFBR1*, *TGFBR2* (Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor 1/2), *TGFB2*, *TGFB3*, *SMAD3*) et les anévrismes et dissections de l'aorte thoracique familiale (*TGFBR2*) (322-324). Le syndrome de Marfan peut également y être inclus, bien que la mutation causale ne soit pas directement dans un constituant de la voie de signalisation TGF- $\beta$ . En effet, le syndrome de Marfan résulte d'une mutation du gène *FBNI* (Fibrilin-1), un composant de la matrice extracellulaire qui interagit avec les LTBP (Latent transforming growth factor beta-binding proteins), les protéines responsables de la séquestration de TGF- $\beta$  au niveau de la matrice (325-327). Cette mutation résulte en une augmentation de l'activation de la voie TGF- $\beta$  dans les tissus conjonctifs,

entraînant, entre autres, la dilatation et la dissection de l'aorte (328, 329). Le syndrome de Shprintzen-Goldberg, un syndrome qui présente beaucoup de similitudes avec le syndrome LDS et le syndrome de Marfan, est aussi un bon exemple (330, 331). Ce syndrome résulte parfois de la mutation du gène *SKI* (V-Ski Avian Sarcoma Viral Oncogene Homolog), un répresseur de la voie TGF- $\beta$  (332). La dérégulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  en absence de mutations peut aussi causer la sclérose systémique, la fibrose pulmonaire et la sclérodermie (321). Toutefois, les patients atteints du syndrome CAID ne présentent pas de chevauchements phénotypiques avec les syndromes décrits ci-dessus.

#### **1.10.4 – Interaction entre la voie de signalisation TGF- $\beta$ et le complexe de la cohésine**

Notre étude sur le syndrome CAID publié en 2014 a permis la première identification clinique d'interaction entre la cascade TGF- $\beta$  et les cohésinopathies. En effet, les patients CAID présentent une augmentation de la phosphorylation de SMAD2/3 autant au niveau basal qu'après stimulation avec TGF- $\beta$ 1 par rapport aux contrôles de type sauvage (1). D'autre part, des études histologiques effectuées sur des coupes intestinales de patients CAID ont révélé une fibrose étendue caractéristique de l'activation chronique de la voie TGF- $\beta$  (1). Ces résultats suggèrent un rôle de SGO1 dans la régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  qui est, à ce jour, inconnu. D'autre part, d'autres constituants du complexe de la cohésine, PP2A et BUB1, qui sont également des interacteurs de SGO1, ont été identifiés comme étant impliqués dans la voie de signalisation TGF- $\beta$ . En effet, la sous-unité Balpha (PPP2R2A) de PP2A augmente la signalisation TGF- $\beta$  en stabilisant les niveaux de base des récepteurs de type I, alors que la sous-unité Bdelta (PPP2R2D) module négativement ces voies en limitant l'activité des récepteurs (333). Fait intéressant, la sérine/thréonine kinase BUB1, qui est impliquée dans la localisation centromérique de SGO1, est requise pour la régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  via le recrutement des récepteurs TGF- $\beta$  de type I (Figure 41) (334). Lors de la stimulation de la voie par le ligand TGF- $\beta$ , BUB1 interagit avec TGFBR1 et favorise l'hétérodimérisation de TGFBR1 et TGFBR2 (334). BUB1 interagit également avec TGFBR2, ce qui suggère que BUB1, TGFBR1 et TGFBR2 forment un complexe ternaire (334). La capacité de BUB1 à promouvoir

la voie de signalisation TGF- $\beta$  dépend de son activité kinase qui est essentielle au recrutement des R-SMADs et l'activation subséquente des voies canonique et non canonique (334).



**Figure 37. Modèle du rôle de BUB1 dans la signalisation TGF- $\beta$ .** (Adapté de (334)).



## **Chapitre 2: Hypothèses et objectifs**

### **2.1 - Problématique**

CAID est un syndrome rare avec des manifestations sévères et d'énormes souffrances. À ce jour, plusieurs patients sont décédés. Il est possible d'offrir une thérapie efficace avec l'implantation d'un stimulateur cardiaque, mais il n'y a aucune thérapie causale pour les intestins. L'identification de dérégulation au niveau de voies de signalisation pouvant être ciblées par des médicaments pourrait permettre le développement d'un traitement pour le syndrome CAID, mais aussi pour d'autres troubles comme la MNS, la POIC et le syndrome du côlon irritable qui affectent des patients du monde entier.

### **2.2 - Hypothèses**

Notre hypothèse principale repose sur l'existence d'un nouveau rôle non canonique de SGO1 dans la pathophysiologie de CAID. Plus précisément, notre hypothèse est que SGO1 joue un rôle non canonique direct ou indirect dans la régulation de la transcription génique lors du développement embryonnaire du nœud sinusal et du système gastro-intestinal, dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation des marques épigénétiques. De ce fait, la mutation K23E perturbe cette fonction de SGO1 et contribue au développement de l'arythmie généralisée observée chez les patients. Notre hypothèse secondaire est que SGO1 joue un rôle non canonique dans la régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ , possiblement via la délocalisation de SGO1 au niveau cytosolique.

### **2.3 - Objectifs et méthodologie générale**

L'objectif principal de ce projet de recherche est de caractériser les conséquences fonctionnelles de la mutation *SGO1* K23E au niveau des fibroblastes de peau de patients CAID. Nos objectifs spécifiques sont :

- La caractérisation du transcriptome des patients CAID vs contrôles de type sauvage par séquençage de l'ARN (RNAseq).

- La caractérisation du protéome des patients CAID vs contrôles de type sauvage par «Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture» (SILAC).
- La caractérisation de l'épigénome des patients CAID vs contrôles de type sauvage par «Reduced Representative Bisulfite Sequencing» (RRBS), par «Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput Sequencing» (ATAC-seq) et par quantification des marques d'histones par Western Blot.
- La validation des résultats par Immunohistologie, électrophysiologie et pyroséquençage des rétrotransposons *LINE-1*.
- La caractérisation des voies de signalisation canonique et non canonique de TGF- $\beta$  par «Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay» (AlphaScreen).
- La caractérisation du syndrome CAID dans le spectre des cohésinopathies afin d'identifier les ressemblances et les différences et d'étudier les découvertes mécanistiques récentes dans le but d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes potentiels impliqués dans le syndrome CAID.

## Chapitre 3: Article 1

### The expanding phenotypes of cohesinopathies: One ring to rule them all!

**Statut de la publication :** Article publié en ligne le 13 septembre 2019. Publié dans le journal Cell cycle, 2019 Nov;18(21):2828-2848.

**Author(s):** Jessica Piché<sup>1</sup>, Patrick Piet van Vliet<sup>1</sup>, Gregor Andelfinger<sup>1</sup>, Michel Puceat<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cardiovascular Genetics, Department of Pediatrics, Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine Research Centre, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup> INSERM U- 1251, Université Aix-Marseille, Marseille, France; Cardiovascular Genetics, Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada; Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and Laboratoire International Associé INSERM, Marseille France-CHU Ste Justine, Québec, Canada.

**Funding:** This work was supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (ZonMW), the Fonds for Wetenschappelijk Onderzoek (FWO), and the Agence Nationale de Recherche (ANR) for the E-RARE CoHEART network.

**Author Contributions:** Jessica Piché and Gregor Andelfinger wrote the paper. Patrick Piet van Vliet and Michel Pucéat provided critical revision.

#### Abbreviations

AD: Alzheimer Disease; AFF4: AF4/FMR2 Family Member 4; ANKRD11: Ankyrin Repeat Domain 11; APC: Anaphase Promoter Complex; ASD: Atrial Septal Defect; ATRX: ATRX Chromatin Remodeler; ATRX: Alpha Thalassemia X-linked intellectual disability syndrome; BIRC5: Baculoviral IAP Repeat Containing 5; BMP: Bone Morphogenetic Protein; BRD4: Bromodomain Containing 4; BUB1: BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase;

CAID: Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia; CDK1: Cyclin Dependent Kinase 1; CdLS: Cornelia de Lange Syndrome; CHD: Congenital Heart Disease; CHOPS: Cognitive impairment, coarse facies, Heart defects, Obesity, Pulmonary involvement, Short stature, and skeletal dysplasia; CIPO: Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction; c-kit: KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase; CoATs: Cohesin Acetyltransferases; CTCF: CCCTC-Binding Factor; DDX11: DEAD/H-Box Helicase 11; ERG: Transcriptional Regulator ERG; ESCO2: Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2; GJC1: Gap Junction Protein Gamma 1; H2A: Histone H2A; H3K4: Histone H3 Lysine 4; H3K9: Histone H3 Lysine 9; HCN4: Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 4; p HDAC8: Histone deacetylases 8; HP1: Heterochromatin Protein 1; ICC: Interstitial Cells of Cajal; ICC-MP: Myenteric Plexus Interstitial cells of Cajal; ICC-DMP: Deep Muscular Plexus Interstitial cells of Cajal; If: Pacemaker Funny Current; IP3: Inositol trisphosphate; JNK: C-Jun N-Terminal Kinase; LDS: Loeys-Dietz Syndrome; LOAD: Late-Onset Alzheimer Disease; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; MAU: MAU Sister Chromatid Cohesion Factor; MFS: Marfan Syndrome; NIPBL: NIPBL, Cohesin Loading Factor; OCT4: Octamer-Binding Protein 4; P38: P38 MAP Kinase; PDA: Patent Ductus Arteriosus; PDS5: PDS5 Cohesin Associated Factor; P-H3: Phospho Histone H3; PLK1: Polo Like Kinase 1; POPDC1: Popeye Domain Containing 1; POPDC2: Popeye Domain Containing 2; PP2A: Protein Phosphatase 2; RAD21: RAD21 Cohesin Complex Component; RBS: Roberts Syndrome; REC8: REC8 Meiotic Recombination Protein; RNAP2: RNA polymerase II; SAN: Sinoatrial node; SCN5A: Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5; SEC: Super Elongation Complex; SGO1: Shogoshin-1; SMAD: SMAD Family Member; SMC1A: Structural Maintenance of Chromosomes 1A; SMC3: Structural Maintenance of Chromosomes 3; SNV: Single Nucleotide Variant; SOX2: SRY-Box 2; SOX17: SRY-Box 17; SSS: Sick Sinus Syndrome; STAG2: Cohesin Subunit SA-2; TADs: Topology Associated Domains; TBX: T-box transcription factors; TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor  $\beta$ ; TGFBR: Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor; TOF: Tetralogy of Fallot; TREK1: TREK-1 K(+) Channel Subunit; VSD: Ventricular Septal Defect; WABS: Warsaw Breakage Syndrome; WAPL: WAPL Cohesin Release Factor.

## Abstract

Preservation and development of life depend on the adequate segregation of sister chromatids during mitosis and meiosis. This process is ensured by the cohesin multi-subunit complex. Mutations in this complex have been associated with an increasing number of diseases, termed cohesinopathies. The best characterized cohesinopathy is Cornelia de Lange syndrome (CdLS), in which intellectual and growth retardations are the main phenotypic manifestations. Despite some overlap, the clinical manifestations of cohesinopathies vary considerably. Novel roles of the cohesin complex have emerged during the past decades, suggesting that important cell cycle regulators exert important biological effects through non-cohesion-related functions and broadening the potential pathomechanisms involved in cohesinopathies. This review focuses on non-cohesion-related functions of the cohesin complex, gene dosage effect, epigenetic regulation and TGF- $\beta$  in cohesinopathy context, especially in comparison to Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia (CAID) syndrome, a very distinct cohesinopathy caused by a homozygous Shugoshin-1 (*SGO1*) mutation (K23E) and characterized by pacemaker failure in both heart (sick sinus syndrome followed by atrial flutter) and gut (chronic intestinal pseudo-obstruction) with no intellectual or growth delay. We discuss the possible impact of *SGO1* alterations in human pathologies and the potential impact of the *SGO1* K23E mutation in the sinus node and gut development and functions. We suggest that the human phenotypes observed in CdLS, CAID syndrome and other cohesinopathies can inform future studies into the less well-known non-cohesion-related functions of cohesin complex genes.

## Keywords

Cohesinopathies, Cohesin complex, *SGO1*, CAID syndrome, TGF- $\beta$  signaling, epigenetics

## Introduction

Mitotic or meiotic cell divisions are essential for the functioning and the reproduction of the living. The cell cycle is divided into four phases, i.e. the G1, S, G2 and M phases. The M phase is itself divided into several stages termed prophase, metaphase, anaphase, and telophase, which is followed by the cytokinesis where the cytoplasm splits to form two daughter cells. Until the sister chromatids segregate at the anaphase, they are held together by a multiprotein complex, the cohesin. The functions of the cohesin complex in mitotic and meiotic division need to be precisely orchestrated in time and space (reviewed in more detail in (1, 2)). Additionally, new biological roles of the cohesin complex and its partner proteins have emerged, including DNA damage checkpoint and repair, DNA replication, gene transcription regulation, and chromatin structure (3–6). Such functions are compatible with the observation that human patients with mutations in components of the cohesin complex or its regulators, a condition named cohesinopathy, exhibit predominantly developmental phenotypes with mild or no defects in cell cycle, which are not sufficient to cause a deleterious phenotype (7–9). A misshaping of the chromatin configuration in the proximity of genes may affect their transcription at the time of a cell fate decision or alter cellular functions (4, 10). The expanding number of genes and proteins involved in the clinical spectrum of cohesinopathies generates novel hypotheses on how the cohesin complex and its regulators impact organ development and maintenance before and after birth.

The purpose of this review is to discuss the recent findings about the molecular pathways underlying cohesinopathies, specifically exploiting contrasting genotype-phenotype correlations of CAID syndrome, a very distinct cohesinopathy characterized by sick sinus syndrome (SSS) and chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO), versus other cohesinopathies. We exploit the fact that the phenotype of CAID syndrome, a monogenic disease caused by the recessive founder mutation *SGO1* K23E, cannot be fully reconciled with a perturbation of the canonical function of this gene in cell cycling alone. We review commonalities and differences in cohesinopathies and CAID syndrome with the goal to inform future directions of research, with an emphasis on non-cohesion-related functions of the cohesin complex.

## **Structure and role of the cohesin complex and its regulators in chromosome segregation**

The mitotic cohesin complex consists of four subunits: Structural Maintenance of Chromosomes 1 (SMC1) and Structural Maintenance of Chromosomes 3 (SMC3) (which form a heterodimer), RAD Cohesin Complex Component (RAD21 in mitosis, REC8 Meiotic Recombination Protein in meiosis) and Cohesin Subunit SA (STAG) (STAG1/STAG2 in mitosis and STAG3 in meiosis) which together establish the cohesin ring structure (Figure 1). Loading and unloading of the cohesin complex on chromosomes is ensured by a “dual gate” mechanism. The NIPBL Cohesin Loading Factor/MAU Sister Chromatid Cohesion Factor (NIPBL/MAU2) complex loads the cohesin onto chromatids during the G1 phase of mitotic/meiotic cell cycle. To do so, NIPBL first needs to bind MAU2, which is located on the closed cohesin ring with the ATP-bound heads engaged (11). Then, NIPBL activates cohesin ATPase activity to separate the heads and activate conformational change to open the cohesin ring and allow DNA entry (11). During S phase, cohesion establishment is intimately linked to DNA replication and requires that both sister chromatids are entrapped within the cohesin ring (11). This ring must also stay closed to prevent premature release of sister chromatids. This function is ensured by the acetylation of SMC3 by Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2 (ESCO2), making the cohesin complex insensitive to WAPL Cohesin Release Factor (WAPL) (11–13). In vertebrates, the cohesin complex is divided into two pools that are removed in two stages. The first pool, namely the WAPL sensitive pool, is removed from chromosome arms in mitotic prophase by the PDS5 Cohesin Associated Factor (PDS5)/WAPL complex through phosphorylation of SA and sororin by Polo Like Kinase 1 (PLK1) and Cyclin Dependent Kinase 1 (CDK1), respectively (11). Sororin phosphorylation disrupts its interaction with PDS5, which is now available to interact with WAPL and release cohesin (11, 14). At the centromeres, the cohesin complex is stabilized by SGO1, which recruits the protein phosphatase Protein Phosphatase 2 (PP2A) to prevent SA subunit phosphorylation (15). PP2A dephosphorylates sororin, maintaining its association with PDS5 [11]. Cohesin is also maintained in the centromeric region by the inhibition of separase by securin (16). Once the alignment of sister chromatids is complete, the anaphase promoter complex (APC) ubiquitinates securin, thereby releasing separase that will cleave RAD21 and dissociate the rest

of the cohesin complex to the centromeres to allow segregation of sister chromatids (16). At the end of mitosis, ESCO2-induced acetylation of SMC3 during S phase is reversed by Histone Deacetylase 8 (HDAC8), SMCs are recycled and re-loaded onto chromatin (17, 18).

## **Cohesinopathies: Common and distinct phenotypes**

Pathologies arising from mutations in the cohesin complex or its regulators are collectively called cohesinopathies, presenting both phenotypic similarities and differences.

Among these syndromes, the best defined and common is the Cornelia de Lange syndrome (CdLS, OMIM #122,470, # 300,590, # 610,759, # 614,701 and # 300,882) with a prevalence of 1/100 000 to 1/10 000 live births (19, 20). CdLS is caused by dominant mutations in genes encoding for the cohesin regulators NIPBL (~50–70%) and HDAC8 (~4%) or structural components such as SMC1A (3–5%), SMC3 (3%) and RAD21 (~1%) (21, 22). More recently, mutations in Bromodomain Containing 4 (BRD4) (1 individual), a NIPBL interactor, and Ankyrin Repeat Domain 11 (ANKRD11) (5 individuals), an inhibitor of ligand-dependent activation of transcription, were also found in CdLS (21). The functional interaction of ANKRD11 with the cohesin complex is currently unknown (21). Patients with CdLS mainly display developmental delay and short stature with particular phenotypic characteristics that are listed in Table 1. Mutations in genes other than *NIPBL* tend to be less severe. Mosaicism in *NIPBL* variants has been found in 15–20% of patients with classic CdLS features and is thought to be main mechanism responsible for variable expressivity (22, 23). The presence of cardiovascular and gastrointestinal disorders is also particularly frequent in CdLS. Indeed, tetralogy of Fallot (TOF), the most common form of cyanotic congenital heart disease consisting of four common heart defects (ventricular septal defect (VSD), pulmonary stenosis, aortic displacement, and right ventricular hypertrophy), accounts for about 50% of cardiac malformations present in CdLS patients. They may also have VSD or atrial septal defect (ASD), valvular abnormalities, and patent ductus arteriosus (PDA) (24). In contrast to CAID syndrome, sick sinus syndrome has never been observed in CdLS. At gastrointestinal level, some patients with CdLS also suffer from gastroesophageal reflux disease, constipation, and feeding difficulties (21, 25).



Robert's syndrome (RBS, OMIM # 268,300) is a rare autosomal recessive disorder resulting from mutations in the gene encoding ESCO2, a cohesin complex regulator (26, 27). Some RBS clinical features overlap with CdLS, including mild to severe growth deficiency, limb malformations, craniofacial anomalies, and mental retardation, but there are obvious differences between both syndromes (Table 1). RBS patients also exhibit heart defects (VSD, ASD, and PDA) but no gastrointestinal defects have been reported (28). At the cellular level, RBS patients display mitotic defects, including lagging chromosomes, aneuploidy and micronuclei formation (nucleoli fragmentation) due to premature sister chromatids segregation, especially in heterochromatin regions (9, 29).

Less well characterized cohesinopathies include Warsaw breakage syndrome (WABS, OMIM #613,398), resulting from recessive mutations in the DEAD/H-Box Helicase 11 (*DDX11*) gene encoding an Iron-Sulfur DNA helicase essential for chromatid cohesion, and the X-linked  $\alpha$ -thalassemia mental retardation syndrome (ATRX, OMIM # 300,032) which is caused by dominant mutations in ATRX Chromatin Remodeler (*ATRX*) gene, a chromatin remodeler that contributes to chromosome dynamics during mitosis (30–32). WABS patients share phenotypic characteristics with CdLS and RBS (Table 1). Like RBS, they also display sister chromatin cohesion defects with typical railroad track appearance of chromosomes during metaphase, due to lack of cohesion in centromeric regions (30). Such a centromeric cohesion defect is considered to be pathognomonic for cohesinopathies at cellular level. At clinical level, some patients with WABS also have TOF and VSD, but no intestinal involvement has been described to date (30,33). WABS also present a unique phenotype, namely Fanconi anemia, which is not found in any other cohesinopathy (30). ATRX syndrome also exhibits a unique phenotype, namely the  $\alpha$ -Thalassemia syndrome (34). At cardiac level, ATRX patients may also have VSD, ASD, TOF, congenital heart disease (CHD), valvular abnormalities and PDA (34). Some patients with ATRX also suffer from gastroesophageal reflux disease and constipation (35).

Gain-of-function mutations in AF4/FMR2 Family Member 4 (*AFF4*) has been found in patients with clinical features similar to CdLS. This syndrome named Cognitive impairment and coarse facies, Hear defects, Obesity, Pulmonary involvement, Short stature and skeletal dysplasia (CHOPS, OMIM # 616,368) (36). The main heart phenotypes include VSD and PDA

(36). Like the ATRX syndrome, the main gastrointestinal manifestations of CHOPS syndrome are gastroesophageal reflux and constipation (36). Of note, AFF4 is not a part of the cohesin complex but rather a factor of the super elongation complex (SEC), which regulates the mobilization of the paused RNA polymerase II (RNAP2) machinery. However, the cohesin complex and the SEC complex interact together to promote transition of paused RNAP2 to transcriptional elongation. It has been shown that the cohesin complex promotes this transition, possibly through MAU2/NIPBL complex which is mediated by AFF4 and SEC (37,38). Thus, the mutation of the AFF4 gene disrupts RNAP2 elongation, due to altered genome-wide binding of AFF4 and cohesin (36).

More recently, a familial germline mutation of the cohesin complex subunit STAG2 has been identified in five patients (7). Since this mutation also co-segregates with syndromic mental retardation in a characteristic X-linked recessive pattern, this syndrome was named STAG2-related X-linked Intellectual Deficiency (OMIM # 301,022) (7). Clinical features include moderate intellectual deficiency, short stature, sensory hearing deficiency, large nose, prominent ears, and frontal baldness (Table 1). No defect in sister chromatids cohesion was observed in patient fibroblasts (7). However, they exhibit higher percentage of G2/M cells and upregulation of genes involved in cell division, mitotic regulators, and DNA replication factors (7). De novo heterozygous and hemizygous mutations of *STAG2* in patients with similar phenotype have also been identified, including one patient with VSD (Table 1) (39–42).

We have described a syndrome termed CAID for Chronic Atrial and Intestinal Dysrhythmia (OMIM # 616,201) (8). All affected patients are homozygous carriers of a recessive founder mutation in *SGO1* (K23E), a modulator of the cohesin complex. Clinically, this disorder can be viewed as a progressive failure of pacemaking tissues, the sinoatrial node (SAN) in the heart and the interstitial network of Cajal (ICC) in the gut. CAID patients share a combination of two distinct disorders, the sick sinus syndrome and the chronic intestinal pseudo-obstruction. Consistent with the known roles of SGO1, chromosomes in cultured dermal fibroblasts from affected individuals show the typical railroad appearance of a centromeric cohesion defect (8). Interestingly, the percentage of cells in mitosis is significantly higher in cells from CAID patients and we also identified upregulation of genes involved in cell cycle regulation, as is the case in STAG2-related X-linked Intellectual Deficiency (7, 8, 43).

Additionally, we found enhanced activation of canonical Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling, DNA methylation, chromatin compaction and disruption of potassium currents (43). Intestinal tissues derived from affected individuals display pathological changes in both the enteric nervous system and smooth muscles including disruption of fiber architecture of smooth muscles and extensive fibrosis, which is characteristic of enhanced TGF- $\beta$  signaling (8). Of interest, a recessive mutation of *RAD21* has recently been identified in a consanguineous family of patients with CIPO (OMIM # 611,376) (44). Within that family, megaduodenum, Barrett's long-segmented esophagus, and cardiac abnormalities of varying severity including valvular abnormalities and VSD have been observed (45). In zebrafish, this mutation leads to disturbance of intestinal transit and enteric neuron development, suggesting that this loss of function of RAD21 causes neurogenic CIPO through disruption of the structure and function of enteric innervation (44).

Even though there is some clinical overlap between CAID and other cohesinopathies (valve defects and gastrointestinal defects), CAID patients do not exhibit intellectual and growth delays. Furthermore, whereas the majority of cohesinopathies are manifest at birth with major developmental defects, this is not the case for the syndromes associated with recessive mutations in *SGO1* (CAID) and *RAD21* (CIPO). Patients are healthy at birth and the earliest phenotype occurs about at 6 years of age (8). The lack of major mitotic consequences in CAID syndrome and other cohesinopathies – such as cancer or premature aging – indicates that the cohesion-related function of the cohesin complex, which is to bundle DNA together during all cell cycle phases, is maintained and suggests that non-cohesion-related mechanisms underly the observed phenotypes.

## **Non-cohesion related functions of the cohesin complex and involvement in cohesinopathies**

In addition to its stabilizing role during cell cycling, the cohesin complex is also involved in double-strand DNA break repair, DNA replication, centrosome duplication, chromatin architecture and transcriptional regulation (Figure 2) (46). Several models have emerged to explain these novel functions and their roles in cohesinopathies.

First, studies in *Drosophila* and humans indicate that cohesin can play a dual role both in activation and repression of gene transcription. On the one hand, it can act as a physical barrier to prevent interaction between regulatory regions and inhibit gene transcription (47, 48). The cohesin complex performs this function via the formation of chromosomal loops or topology-associated domains (TADs) that inhibit the interaction between the enhancer and promoter of target genes (48–50). On the other hand, opposite effects can also occur by inhibiting the interaction between an inactivator and a promoter to activate gene transcription (49). This regulation requires the insulator protein CCCTC-Binding Factor (CTCF), which recruits the cohesin complex and defines the loop boundaries (48–51). In order to block the enhancer/promoter (or inactivator/promoter) interaction, the CTCF binding site must be in between the two (52). In mammals, around 90% of cohesin binding loci are at CTCF binding sites (48, 50). However, cohesin can also regulate gene transcription independently of CTCF by forming a complex with the transcriptional coactivator Mediator to activate gene transcription (4). This complex brings enhancer and promoter close together by forming a loop connecting two DNA segments (4). Of note, loops and TADs can also activate gene transcription in the same way (49).

In another non-cohesion-related role, cohesin and NIPBL also mediate interchromosomal and intrachromosomal interactions by forming long-distance DNA loops to regulate gene transcription (4, 53–55). Also, NIPBL can bind DNA independently of the cohesin complex. This function may be involved in the observed developmental phenotype of CdLS patients since the cohesin-independent binding of NIPBL is reduced in their cells (56). Genes bound by NIPBL include transcription factors important for development and have been reported previously to be differentially expressed in CdLS (56). In pluripotent stem cells, cohesin forms a bridge between two enhancers of SRY-Box 2 (*SOX2*) and SRY-Box 17 (*SOX17*) genes in the absence or presence of CTCF, respectively (57). When cells differentiate into endodermal and mesodermal cells, this bridge is disrupted by the reprogramming factor Octamer-Binding Protein 4 (OCT4). The enhancer of *SOX17* is free to fold onto the promoter to interact in the presence of cohesin allowing transcription of *SOX17*, which is required for mesendodermal lineage commitment and subsequent induction of cardiac differentiation (58). A down-regulation of NIPBL prevents these bridge changes and impairs cardiogenesis,

suggesting that *NIPBL* mutations involved in CdLS play a direct role in heart phenotypes identified (57). The cohesin complex is dynamic in its association with chromatin through its different subunits (59). Therefore, mutations of this complex can prevent cohesin binding to specific effectors or disrupt loops and TADs, leading to deficient gene regulation and transcription.

In addition, cohesin regulates sub-nuclear localization of certain genes leading to a subsequent impact on their expression (60–62). Considering the cyclic association of the cohesin complex with the chromosomes, it is quite conceivable that it plays a role in DNA organization in the nucleus and nucleoli. Cohesinopathy-associated mutations of *NIPBL* and *ESCO2* homologs in yeast disrupt subnuclear organization of the chromatin resulting in chromosomal decondensation and aberrant nucleolar morphology (63). Therefore, if the cohesin complex regulates subnuclear localization of DNA sequences involved in embryogenesis, the mutations in the cohesin complex might disrupt this process and thus, explain the observed developmental dysfunctions in cohesinopathies (64). It is however likely that some genes may be more sensitive than others to the 3D configuration of chromatin depending upon their localization on chromosomes. A recent study reported that the cohesin binding sites within the genome differ in two investigated tissues of the same individual (65). Cohesin also regulates ribosomal RNA synthesis in nucleoli, promotes protein translation, and may affect chromosome arrangement throughout nucleoli (66). Cohesinopathy mutations of *ESCO2* and *SMC1A* homologs result in lower production of ribosomal RNA, which is expected to restrain ribosome biogenesis and protein translation (66). Most, but not all cohesinopathy patients are of short stature and weight already at birth (CdLS, RBS, WABS, STAG2 de novo mutations) (21, 28, 30, 33, 39, 40). No such anomalies were reported in ATRX, CHOPS, STAG2 germline mutation, and CAID patients.

## **Gene dosage effects in cohesinopathies**

In Cornelia de Lange syndrome, gene dosage effects play an important role and may indeed underlie the severity of the syndrome. Most mutations responsible for CdLS are point mutations, frame shift or single-nucleotide variants (SNVs) in *NIPBL* gene. However, rare genomic rearrangements such as large deletions have also been seen in some CdLS patients (44,

67, 68). In increasing order of severity, patients with missense mutations have a milder phenotype than those with nonsense mutations or large deletions, suggesting that *NIPBL* is sensitive to gene dosage (69).

CAID syndrome also seems to be sensitive to gene dosage, but in a different way. Since CAID follows an autosomal recessive inheritance mode, heterozygous individuals for the *SGO1* K23E mutation do not show characteristic disease phenotypic manifestations. However, *SGO1* dosage appears to be of fundamental importance in CAID syndrome pathology. Indeed, RNAseq analysis performed on CAID patient dermal fibroblasts reveals overexpression of mutated *SGO1* and several genes involved in cell cycle regulation and cohesin complex. Whether this upregulation is causal or secondary remains to be determined (43). It can be speculated that overexpression of mutated allele coupled to the expression of the wild type allele seems to be sufficient in heterozygous carriers to attenuate direct effects of the *SGO1* K23E mutation and maintain a normal phenotype. On the other hand, it is also possible that this overexpression is causal and leads to CAID phenotype. This hypothesis is further supported since copy number variants (CNVs) of *STAG2* (microduplications and triplication) in individuals with intellectual disability lead to gain of *STAG2* mRNA and protein, dysregulating neuronal gene networks relevant for the disease in patient cells (70). Thus, a similar mechanism may be involved in CAID pathology since we identified upregulation of *SGO1* mRNA and correlated impact on phenotype-compatible pathways (43).

## **Epigenetic regulation in cohesinopathies**

Through life, organisms must orchestrate the expression of genes in time and space to perform certain functions. This depends on transcription regulation, which itself results from epigenetic regulation. Euchromatin, or open chromatin, is associated with gene expression, whereas heterochromatin, or closed chromatin, is associated with gene repression. Several modifications regulate chromatin state, including DNA methylation, post-translational modifications of histones, nucleosomes positioning, and higher chromatin organization. Over the recent years, epigenetic regulation arose as a new pathomechanism in several human diseases and a promising therapeutic avenue. The implication of epigenetic regulation in cohesinopathies have also started to emerge. *NIPBL* haploinsufficient cardiomyocytes cell lines

show dysregulation of many chromatin modifiers, including histone modifiers, nucleosome, and DNA bending complexes, providing evidence for NIPBL's direct or indirect role in epigenetic regulation in CdLS (71). Additionally, ATRX syndrome exhibits specific epigenetic signatures. ATRX regulates histone H3 positioning at the telomeric and pericentromeric heterochromatic regions, histones Histone H3 Lysine 4 (H3K4) and Histone H3 Lysine 9 (H3K9) methylation detection, and DNA methylation (72–74). Methylome characterization of ATRX syndrome patients show a unique enrichment of differentially methylated genes in or close to pericentromeric or telomeric chromosomal regions, suggesting that ATRX mutation disrupts its function in heterochromatin dynamic regulation (75). CAID patient-derived fibroblasts also exhibit a global hypermethylation and chromatin closing signatures, suggesting that epigenetic dysregulation is also part of CAID pathogenesis. This clearly demonstrates the involvement of epigenetics in cohesinopathy pathomechanisms.

## **TGF- $\beta$ and cohesinopathies**

The TGF- $\beta$  family includes a variety of cytokines involved in development, differentiation, tissue repair and tumorigenesis. The regulation of TGF- $\beta$  signaling is based on the transmission of intracellular signals via the TGF- $\beta$  receptors (TGFB $\beta$ R) TGFB $\beta$ RI and TGFB $\beta$ RII, two transmembrane threonine/serine kinase receptors that form heteromeric complexes. The canonical pathway of TGF- $\beta$  signaling depends on SMAD Family Member (SMAD) proteins. Activation by TGF- $\beta$ s, activins and Nodal results in phosphorylation of SMAD2/3, while activation by Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) induces phosphorylation of SMAD1/5/8 (76). TGFB $\beta$ RI is responsible for SMAD2/3 phosphorylation which then form a complex with SMAD4. The SMAD2/3/4 complex enters the nucleus where it regulates transcription of target genes by interaction with different cofactors (76). SMAD1/5/8 also form complexes with SMAD4 to regulate different target genes (76). Noncanonical TGF- $\beta$  signaling is activated in a SMADs-independent manner and includes Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), P38 MAP Kinase (p38) and C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) signaling. Main effectors of those pathways are Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) ERK1/2, p38, and JNK1/2/3, respectively (77).

It is well known that TGF- $\beta$  signaling is a key cascade involved in cardiomyopathy, arrhythmias and valvular diseases (78, 79). Among the TGF- $\beta$ -opathies, we find the Marfan syndrome (MFS) and the Loeys-Dietz Syndrome (LDS) in which increased TGF- $\beta$  signaling causes dilation and dissection of the aorta (80–82). Increased TGF- $\beta$  signaling plays a role in a large number of cardiac conditions, such as hypertrophic and dilated cardiomyopathy (79, 83). In mouse models, enhanced TGF- $\beta$  signaling induces fibrosis in the ventricle, impairs electrical propagation, and leads to arrhythmia development through pathological deposition of extracellular matrix proteins (84–86). The study of TGF- $\beta$  signaling in CAID syndrome revealed an up-regulation of the canonical pathway and its uncoupling from the noncanonical one, suggesting that the *SGO1* K23E mutation favors the canonical TGF- $\beta$  pathway through an unknown mechanism (43). The serine/threonine kinase BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase (BUB1), previously known to be responsible for SGO1 localization at the centromeres, has been found to be essential for the recruitment of TGFBR1 and subsequent regulation of canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling (87). Since we previously showed up-regulation of BUB1 expression in CAID syndrome, it is therefore conceivable that the enhanced canonical TGF- $\beta$  signaling in CAID syndrome is related to BUB1 overexpression, which may provide a clinically relevant crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and the cohesin complex (43). Since BUB1 is required for SGO1 localization at centromere, it seems plausible that BUB1 can also recruit SGO1 in the cytoplasm. Therefore, we hypothesize that cytoplasmic SGO1 might play a role in canonical TGF- $\beta$  pathway by sequestering BUB1 to the canonical pathway only, possibly by steric interference. There is little data on the implication of the TGF- $\beta$  pathway in other cohesinopathies. Interestingly, the BMP pathway was among the most significantly affected cascades in a *Nipbl* $\pm$  CdLS mouse model (88). Compound effects in the *Nipbl* $\pm$ , *Bmp4* $\pm$  double heterozygous mouse cause skeletal abnormalities reminiscent of CdLS, but no overt limb truncations (89). This implies that cohesin-BMP crosstalk explains some, but not all, aspects of certain CdLS phenotypes.

## **SGO1 functions**

First identified through a screen for genes required for centromeric cohesion in yeast, the main function of SGO1 is to protect the cohesin complex from cleavage by separase during



meiotic divisions (90). Separase is a protease that triggers anaphase by cleaving cohesin within the RAD21/REC8 subunit. Related to this task, SGO1 also plays a similar role during mitosis by ensuring proper chromosome segregation (15). There are different isoforms of the SGO1 protein in humans, namely the A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 and P1, which differ mainly by the exclusion, in whole or in part, of the exon 6 and/or exon 9 (Figure 3(a)). The isoforms A2 and C2 are localized at the centrosomes while the isoforms A1 and C1 locate at the centromere to protect the centromeric cohesion (91). Centrosome localization has been shown to be dependent on a small C-terminal peptide encoded by exon 9 (91). Our clinical observations in CAID syndrome do not provide any evidence of a progeria-like phenotype, or of premature development of cancer. In addition, we have described two homozygous females, who successfully carried spontaneous pregnancies to term (8). Thus, mitotic or meiotic dysfunctions do not seem to be in the foreground in CAID syndrome.

Additional roles for SGO1 have emerged recently, such as the protection of centrioles cohesion, and its interaction with Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Figure 3(b)) (92, 93). Furthermore, SGO1 can also interact with Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (BIRC5), an anti-apoptotic gene, through a phospho-mimic sequence at its amino-terminus (Figure 3(b)) (94). We have modeled the *SGO1* K23E mutation and found it has a profound effect on this region, possibly perturbing the binding to a selected set of amino-terminal interaction partners (PP2A, BIRC5) and leaving intact interactions dependent on SGO1 carboxy-terminal domains, such as Histone H2A (H2A) and HP1 (Figure 3(b–d)) (93, 95).

The participation of SGO1 in biological functions of the cohesin complex could also entail consequences at transcriptional level. As discussed previously, it has been shown over the recent years that components of the cohesin complex play important roles in long-range transcriptional regulation (96–98). A non-cohesion-related role of SGO1 and the cohesin complex – possibly through chromatin remodeling and epigenetic marks, given the already identified interaction partners of SGO1 – in maintaining shared transcriptional modules of the SAN and the ICC observed in CAID syndrome, therefore is an intriguing possibility. This begs the question what the commonalities are in SAN and ICC transcriptional regulation both in development and during adult life, and how the cohesin complex is involved in them.

## Effects of SGO1 alterations in human pathologies

Loss of *Sgo1* in yeast leads to poor viability, and loss of its homolog in mice results in embryonic lethality (99,100). Haploinsufficiency of *Sgo1* $\pm$  in mice leads to genomic instability and accelerated development of tumors after exposure to colon carcinogens but does not affect viability or fertility (99). In humans, mutations and alterations of *SGO1* expression are found in hepatocellular carcinoma, and colorectal and gastric cancers (101–103). In addition, reduction of *SGO1* expression by siRNA in cultured cells results in premature chromosome separation and multipolar spindles mitosis, which is characteristic of cohesinopathy (92,104,105). Interestingly, although CAID patients show centromeric cohesion defects (8), they do not exhibit mitotic defects and do not have any type of cancer. This is in line with observations in other cohesinopathies, despite the stark differences in CAID and other cohesinopathy phenotypes. However, since all cohesinopathies, including CAID syndrome, are monogenic diseases with strong effects of the mutant alleles, we put forward that the associated phenotypes (as well as the differences among them) highlight divergent biological roles of the causative genes and their mutations in humans. Based on the autosomal recessive mode of inheritance of CAID syndrome, with a single causative gene and no known modifiers, we speculate that the effects of the *SGO1* K23E mutation could be due to one or more of the following mechanisms; (a) a gain of function, (b) a change of function, (c) a noncanonical (not related to protection of the cohesin ring during mitosis and centrosome integrity) role for *SGO1* (Figure 4). Unfortunately, the *SGO1* K23E point mutant is lethal in two different mouse backgrounds (129Sv and C57Bl6N), limiting the use of mouse models available for study (data not shown).

Mice haploinsufficient for *Sgo1* $\pm$  show proneness to cancer, chromosome cohesion defect and centrosome number defect leading to chromosome instability and prolonged mitosis and accumulation of  $\beta$ -amyloid in the brain (Figure 4) (99, 106–108). Specifically, brain pathology has a late onset in *Sgo1* $\pm$  mice (108). However, while amyloid deposition is one of several hallmarks of Alzheimer's disease (AD), it is not the only driver. As an example, mouse models overexpressing amyloid, such as 5xFAD and APPSWE/PSEN1deltaE9, do not fully recapitulate the late-onset neurological phenotype (109,110). In human patients, cognitive impairment and memory loss do not closely correlate with the extent of amyloid deposition, and no association between *SGO1* variants and large Late-onset Alzheimer's disease (LOAD)

human cohort has been reported to date (111, 112). Moreover, microglia pathology or cognitive deficits would need to be investigated in *Sgo1* $\pm$  mice to better understand the potential role of Sgo1 in brain pathologies. Interestingly, the *Sgo1-lacZ* reporter mouse and immunohistochemical data provide evidence for cytosolic localization of Sgo1 in the brain (113, 114). Additional imaging and functional studies of the brain in *Sgo1* $\pm$  mice and CAID patients will yield insight into the potential roles of SGO1 in neurological diseases.

Brains from AD patients exhibit a diffused cytosolic pattern of p-H3 localization, which has been confirmed in brain from *Sgo1* $\pm$  mouse. However, phospho-Histone H3 (p-H3) localization is generally restricted to the nucleus in the majority of organs (115, 116). It was believed that the SGO1 localization was restricted to the nucleus as well, but we have shown its cytosolic localization in several organs (113). Mutated *SGO1* K23E is delocalized to the cytosol in CAID patient fibroblasts, in a pattern reminiscent of aberrant p-H3 localization in AD brains (8, 115, 116). Since SGO1 and H3 are known to compete with each other for Survivin binding in the nucleus (94), it is conceivable that they might also compete for binding of some unknown partners in the cytoplasm and possess noncanonical roles depending on this cytoplasmic localization. Identification of these roles would have enormous potential for understanding the molecular noncanonical mechanisms involved in CAID syndrome, as well as in AD and cognitive pathologies involved in cohesinopathies.

## **Possible impact of SGO1 mutation on sinus node and gut development and functions**

Since CAID patients exhibit phenotypes associated with pacemaker cell dysfunctions (SSS and CIPO), it is likely that the *SGO1* mutation may play a role in sinus node and gut development and/or homeostasis. The function of the SAN is to initiate the action potentials responsible for heart rhythm. The sinoatrial cells depolarize spontaneously and thus trigger the cardiac action potential. Cardiomyocytes are all connected to each other via gap junctions and a specialized conduction system, which allows action potential propagation throughout the entire organ. In mice, development and physiological functions of the sinus node have been dissected in great detail (for review, see (117, 118)). The transcriptional cascades required for proper embryonic development of the sinus node require T-box transcription factors (TBX) and

other finely orchestrated cues to repress a genetic program that otherwise would lead to the development of working myocardium (118–120). Lineage tracing experiments have shown that mesenchymal precursors are recruited to the myocardial lineage to form the SAN. Growth of the SAN is achieved by proliferation of a subpopulation of specified SAN primordial cells. The developmental default program for all cardiomyocytes is that of working myocardium; where it is repressed by transcription factors *Tbx3* and *Tbx18*, the SAN will develop (119, 120).

A distinct set of molecular markers has been found to be characteristic for adult sinoatrial cells, including Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium and Sodium Channel 4 (*HCN4*), which is a channel generating the pacemaker funny current (*I<sub>f</sub>*), and Gap Junction Protein Gamma 1 (*GJC1* or *CX45*), which is a gap junction protein (121, 122). Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5 (*SCN5A*), the cardiac sodium channel responsible for rapid depolarization, is highly expressed in the SAN, but also present in cardiomyocytes (123). Mutations in *SCN5A* and *HCN4* are linked to SSS and sinus bradycardia, respectively, in man (124, 125). Of note, gastrointestinal motility disorders have been identified in Brugada and long QT syndromes caused by *SCN5A* mutations (126, 127). *SCN5A* is also expressed in ICC and mutations in *SCN5A* have been reported in irritable bowel syndrome (~2%), reinforcing the notion that both Cajal cells and the SAN share selected functional similarities at electrophysiological level (128, 129).

In the gut, ICC networks contribute to a large number of functions that are important for gastrointestinal motility, such as the production, coordination, and propagation of slow electric waves that control intestinal contractions, the coordination of the stimulation and propagation of slow electric wave, the signal transduction from the enteric nervous system to motor neurons to activate contraction of smooth muscle and the sensing to mechanical stretching of gastrointestinal smooth muscle (130). The ICC associated with the myenteric plexus (ICC-MP) generates pacemaker activity via slow waves that are transmitted to the circular muscle layer (131, 132). Initiation of slow waves occurs in the proximal intestine and control the peristaltic contractions (133). Several mechanisms have been developed to explain the generation of electrical slow waves by the interstitial cells of Cajal. First, a chloride channel would be responsible for rhythmic depolarization leading to the rise of slow electric waves (134). The second, meanwhile, suggested that potassium channels encoded by the gene Transcriptional Regulator ERG (*ERG*) ensure the function of stimulator channels (135). However, the most

plausible hypothesis is that the generation of slow electric waves is due to an increase in intracellular Inositol trisphosphate (IP3) induced-calcium release via the smooth endoplasmic reticulum through a mechanism reminding the one observed in the earliest cardiac pacemaker cells located in the left inflow tract (136–138). In fact, the ICC can generate low-frequency rhythmic transient depolarizations in response to rhythmic changes in intracellular calcium (139). During the transmission of depolarizations to muscle layers, phase–amplitude interaction with the slow-wave occurs (139). This causes an electrical slow-wave activity pattern of waxing and waning via coupling of ICC-MP and deep muscular plexus interstitial cells of Cajal (ICC-DMP) phase amplitude and then, a checked pattern of non-propagating motor activity occurs (139). Thus, ICC-MP induction of rhythmic transient depolarizations is a key factor to change the motor pattern from propulsion to segmentation (139).

On the other hand, the embryologic origin and molecular orchestration of ICC in the gut is much less understood. ICC clearly share commonalities with smooth muscle and mesenchymal cells and does not arise from the neural crest (for reviews, see (140, 141)). KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase (C-kit) is a marker of Cajal cells throughout the intestine. Interestingly, mice with a hypomorphic allele of c-kit (W/W<sup>v</sup>) have a severely underdeveloped ICC network and disorder of gastrointestinal motility (132). The same mouse strain is prone to develop atrial fibrillation due to a dysregulation of mast cells, but these mice do not have sick sinus syndrome (142). However, in a different mouse model in which a lacZ reporter disrupts the c-kit locus, c-kit is not required for the embryonic differentiation or survival of ICC, but for postnatal proliferation (143).

There are several principle modes by which the mutation of *SGO1* could exert its deleterious effects on the human pacemakers. First, *SGO1* may guard pacemaker functions through maintaining proper expansion of SAN and ICC precursors during embryogenesis. *BIRC5*, a known interactor of *SGO1*, is involved in the control of cardiomyocyte numbers and its cardiac-specific knock-out leads to conduction defects and SAN dysfunction (144, 145). Interestingly, we found upregulation of *BIRC5* expression in CAID patients skin fibroblast at young and late passages (43). How the upregulation of *BIRC5* is associated to SSS in CAID syndrome remain unclear. Since the *BIRC5* interaction site on *SGO1* is near the K23E mutation (Figure 3), it is conceivable that the mutation alters *BIRC5* binding. Thus, *BIRC5* overexpression might be compensatory, but insufficient. It could also reflect a phenomenon

often observed in human genetics, namely that opposite alterations of gene dosage have a similar, and not necessarily opposed, phenotypic outcome. On the other hand, since increased *BIRC5* expression has been associated with aging in human skin fibroblasts, it could be speculated that premature aging of more vulnerable cell populations, such as the SAN or its precursors, plays a role in CAID syndrome and SAN dysfunction through a mechanism different from loss of *BIRC5* (146). Since gastrointestinal motility and sinus rhythm are universally present at birth in CAID, we conclude that the initial formation of the SAN and ICC network must have occurred in sufficient fashion. Also, it has been well documented that even a large reduction of SAN size is clinically tolerated without loss of sinus rhythm (147, 148).

Second, *SGO1* may guard pacemaker functions by preventing premature senescence and fibrosis in the SAN, the left atrium and the ICC network. The observation that CAID replicates all features of bradycardia-tachycardia syndrome suggests that processes leading to this condition in the elderly may be accelerated in our patients. Premature aging of SAN and ICC subpopulations therefore remains a possibility as a cause for SSS. However, we have not observed other phenotypes overlapping with progeria syndromes in CAID, and it is unclear how and why the *SGO1* founder mutation affects only a very specific subset of cells in the human body. A genetic basis for age-related sinus node dysfunction under stress has recently been demonstrated in mice deficient for the popeye domain containing proteins Popeye Domain Containing 1 (POPDC1) and Popeye Domain Containing 2 (POPDC2). In this model, POPDC1 and POPDC2 are required for the integrity of a macromolecular complex at the cell membrane to ensure proper gating of the 2-pore domain potassium channel TREK-1 K(+) Channel Subunit (TREK1) (149). Senescence induction by *SMC1A* deficiency has also been identified, providing a plausible explanation for the accelerated aging phenotype found in CdLS (150). Therefore, senescence may be a common mechanism among cohesinopathies. Outstanding questions include whether *SGO1* K23E impairs cohesin loading or chromosomal configuration, and whether this could occur in a cell-type specific context.

Finally, *SGO1* may guard pacemaker functions by direct effects on transcriptional regulation of target genes conferring pacemaking properties to the SAN and the ICC network. Numerous studies have addressed in detail the transcriptional profile and electrophysiologic properties of SAN cells, and to a lesser extent those of the ICC network. It is conceivable that

SGO1 contributes to maintaining cell-type specific expression signatures of those specialized cells postnatally through yet unidentified mechanisms.

## **Conclusion**

Human cohesinopathies are genetically heterogeneous, monogenic disease caused by strong effects of the disease-causing alleles. In vitro studies of cohesin complex genes have been mostly informed by the role these genes in cell cycling. Here, we compare different human cohesinopathy phenotypes and propose that non-cohesion related roles of the cohesin complex are likely to be of crucial importance in the pathomechanisms of these disorders. In this review, we used these comparisons to further describe mechanisms associated with gene transcription regulation, chromatin 3D architecture, gene dosage effects, epigenetic regulation, and TGF- $\beta$  signaling. Increasingly, the study of single-gene disorders indicates that associated phenotypes can result from perturbation of multiple pathways, rather than single cascades. Since the cohesin complex regulates the expression of genes involved in several pathways, including genes involved in development, mutations in cohesin complex components are likely to alter chromatin structure, resulting in developmental defects. Gene dosage also seems to be a main component of cohesinopathy severity, especially in CdLS, STAG2 intellectual deficiency, and CAID syndrome. Epigenomic studies of cohesinopathies may be particularly promising, since numerous drugs targeting specific epigenetic modifications are already approved or under development. As a result, understanding cohesinopathies promises to also yield insights into potential treatments for more common cardiac and intestinal conditions.

## **Correspondence**

Address correspondence to: Gregor Andelfinger, MD, FRCPC, Service of Cardiology, Department of Pediatrics, Cardiovascular Genetics Research Laboratory, Centre Hospitalier Sainte Justine Research Center, Université de Montréal 3175, Chemin Côte Sainte Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada. E-mail: [gregor.andelfinger@umontreal.ca](mailto:gregor.andelfinger@umontreal.ca), fax: (514) 345-4896.

## **Acknowledgements**

We are profoundly thankful to all participating families and patients with CAID syndrome. We acknowledge de CoHEART Consortium for the long-standing support of Jeroen Bakkers, Bart Loeys, Michel Pucéat and Gregor Andelfinger. Gregor Andelfinger holds the Banque Nationale Chaire d'Excellence en Recherche in Cardiovascular Genetics.



## References

1. Nasmyth K, Haering CH. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual review of genetics* 2009; 43:525-58.
2. Brooker AS, Berkowitz KM. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:229–266.
3. Luo H, Li Y, Mu JJ, et al. Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *J Biol Chem.* 2008;283:19176–19183.
4. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature.* 2010;467:430–435.
5. Litwin I, Pilarczyk E, Wysocki R. The emerging role of cohesin in the DNA damage response. *Genes (Basel).* 2018;9:581.
6. Dorsett D, Merkenschlager M. Cohesin at active genes: a unifying theme for cohesin and gene expression from model organisms to humans. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:327–333.
7. Soardi FC, Machado-Silva A, Linhares ND, et al. Familial STAG2 germline mutation defines a new human cohesinopathy. *NPJ Genom Med.* 2017;2:7.
8. Chetaille P, Preuss C, Burkhard S, et al. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *Nat Genet.* 2014;46:1245–1249.
9. Tomkins DJ, Sicken JE. Abnormalities in the cell-division cycle in Roberts syndrome fibroblasts: a cellular basis for the phenotypic characteristics? *Am J Hum Genet.* 1984;36:1332–1340.
10. Phillips-Cremins JE, Sauria ME, Sanyal A, et al. Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell.* 2013;153:1281–1295.
11. Makrantonis V, Marston AL. Cohesin and chromosome segregation. *Curr Biol.* 2018;28:R688–r93.
12. Zhang J, Shi X, Li Y, et al. Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell.* 2008;31:143–151.
13. Alomer RM, Da Silva EML, Chen J, et al. Escol1 and Escol2 regulate distinct cohesin functions during cell cycle progression. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2017;114:9906–9911.
14. Sonoda E, Matsusaka T, Morrison C, et al. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell.* 2001;1:759–770.
15. Gutierrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendas AM. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends Genet.* 2012;28:351–360.
16. Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, et al. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell.* 2000;103:375–386.
17. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature.* 2012;489:313–317.
18. Hou F, Zou H. Two human orthologues of Eco1/Ctf7 acetyltransferases are both required for proper sister-chromatid cohesion. *Mol Biol Cell.* 2005;16:3908–3918.
19. Pearce PM, Pitt DB. Six cases of de Lange's syndrome; parental consanguinity in two. *Med J Aust.* 1967;1:502–506.
20. Opitz JM. The Brachmann-de Lange syndrome. *Am J Med Genet A.* 1985;22:89–102.

21. Kline AD, Moss JF, Selicorni A, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet.* 2018;19:649–666.
22. Ansari M, Poke G, Ferry Q, et al. Genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome (CdLS) and CdLS-like phenotypes with observed and predicted levels of mosaicism. *J Med Genet.* 2014;51:659–668.
23. Huisman SA, Redeker EJ, Maas SM, et al. High rate of mosaicism in individuals with Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet.* 2013;50:339–344.
24. Chatfield KC, Schrier SA, Li J, et al. Congenital heart disease in Cornelia de Lange syndrome: phenotype and genotype analysis. *Am J Med Genet Part A.* 2012;158a:2499–2505.
25. Luzzani S, Macchini F, Valade A, et al. Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. *Am J Med Genet Part A.* 2003;119a:283–287.
26. Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet.* 2005;37:468–470.
27. Chang S, Gordillo M, Jabs EW, et al. The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. *Hum Mol Genet.* 2008;17:2172–2180.
28. Gordillo M, Vega H, Jabs EW, et al. Roberts Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle: University of Washington; 1993. Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
29. Xu B, Lu S, Gerton JL. Roberts syndrome: A deficit in acetylated cohesin leads to nucleolar dysfunction. *Rare Dis (austin, Tex).* 2014;2:e27743.
30. van der Lelij P, Chrzanowska KH, Godthelp BC, et al. Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChlR1. *Am J Hum Genet.* 2010;86:262–266.
31. Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AO, et al. X-linked alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. *American J Hum Genet.* 1992;51:1136–1149.
32. Ritchie K, Seah C, Moulin J, et al. Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J Cell Biol.* 2008;180:315–324.
33. Capo-Chichi JM, Bharti SK, Sommers JA, et al. Identification and biochemical characterization of a novel mutation in DDX11 causing Warsaw breakage syndrome. *Hum Mutat.* 2013;34:103–107.
34. Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:15.
35. Martucciello G, Lombardi L, Savasta S, et al. Gastrointestinal phenotype of ATR-X syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2006;140:1172–1176.
36. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, et al. Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nat Genet.* 2015;47:338–344.
37. Schaaf CA, Kwak H, Koenig A, et al. Genome-wide control of RNA polymerase II activity by cohesin. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003382.
38. Lopez-Serra L, Kelly G, Patel H, et al. The Scc2-Scc4 complex acts in sister chromatid cohesion and transcriptional regulation by maintaining nucleosome-free regions. *Nat Genet.* 2014;46:1147–1151.

39. Mullegama SV, Klein SD, Mulatinho MV, et al. De novo loss-of-function variants in STAG2 are associated with developmental delay, microcephaly, and congenital anomalies. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173:1319–1327.
40. Mullegama SV, Klein SD, Signer RH, et al. Mutations in STAG2 cause an X-linked cohesinopathy associated with undergrowth, developmental delay, and dysmorphia: Expanding the phenotype in males. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7:e00501
41. Yuan B, Neira J, Pehlivan D, et al. Clinical exome sequencing reveals locus heterogeneity and phenotypic variability of cohesinopathies. *Genet Med*. 2019;21:663–675.
42. Aoi H, Lei M, Mizuguchi T, et al. Nonsense variants in STAG2 result in distinct sex-dependent phenotypes. *J Hum Genet*. 2019.
43. Piche J, Gosset N, Legault LM, et al. Molecular signature of CAID syndrome: noncanonical roles of SGO1 in regulation of TGF-beta signaling and epigenomics. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7:411–431.
44. Bonora E, Bianco F, Cordeddu L, et al. Mutations in RAD21 disrupt regulation of APOB in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology*. 2015;148:771–82.e11.
45. Mungan Z, Akyuz F, Bugra Z, et al. Familial visceral myopathy with pseudo-obstruction, megaduodenum, Barrett's esophagus, and cardiac abnormalities. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2556–2560.
46. Mehta GD, Kumar R, Srivastava S, et al. Cohesin: functions beyond sister chromatid cohesion. *FEBS Lett*. 2013;587:2299–2312.
47. Rollins RA, Korom M, Aulner N, et al. Drosophila nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scs3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol*. 2004;24:3100–3111.
48. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. 2008;451:796–801.
49. Wutz G, Varnai C, Nagasaka K, et al. Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *Embo J*. 2017;36:3573–3599.
50. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, et al. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*. 2008;132:422–433.
51. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, et al. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Nat Acad SciUSA*. 2008;105:8309–8314.
52. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 1999;98:387–396.
53. Zuin J, Dixon JR, van der Reijden MI, et al. Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc Nat Acad SciUSA*. 2014;111:996–1001.
54. Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D. Nipped-B, a Drosophila homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics*. 1999;152:577–593.
55. Busslinger GA, Stocsits RR, van der Lelij P, et al. Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature*. 2017;544:503–507.
56. Zuin J, Franke V, van Ijcken WF, et al. A cohesin-independent role for NIPBL at promoters provides insights in CdLS. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004153.

57. Abboud N, Moore-Morris T, Hiriart E, et al. A cohesin-OCT4 complex mediates Sox enhancers to prime an early embryonic lineage. *Nat Commun.* 2015;6:6749.
58. Stefanovic S, Abboud N, Desilets S, et al. Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol.* 2009;186:665–673.
59. Gerlich D, Koch B, Dupeux F, et al. Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol.* 2006;16:1571–1578.
60. Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, et al. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell.* 2004;13:291–298.
61. Taddei A. Active genes at the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:305–310.
62. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell.* 2007;128:787–800.
63. Gard S, Light W, Xiong B, et al. Cohesinopathy mutations disrupt the subnuclear organization of chromatin. *J Cell Biol.* 2009;187:455–462.
64. McNairn AJ, Gerton JL. Cohesinopathies: one ring, many obligations. *Mutat Res.* 2008;647:103–111.
65. Cuadrado A, Remeseiro S, Grana O, et al. The contribution of cohesin-SA1 to gene expression and chromatin architecture in two murine tissues. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:3056–3067.
66. Bose T, Lee KK, Lu S, et al. Cohesin proteins promote ribosomal RNA production and protein translation in yeast and human cells. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002749.
67. Bhuiyan ZA, Stewart H, Redeker EJ, et al. Large genomic rearrangements in NIPBL are infrequent in Cornelia de Lange syndrome. *Eur J Human Genet.* 2007;15:505–508.
68. Ratajska M, Wierzba J, Pehlivan D, et al. Cornelia de Lange syndrome case due to genomic rearrangements including NIPBL. *Eur J Med Genet.* 2010;53:378–382.
69. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in Cornelia de Lange syndrome. *Hum Mutat.* 2013;34:1589–1596.
70. Kumar R, Corbett MA, Van Bon BW, et al. Increased STAG2 dosage defines a novel cohesinopathy with intellectual disability and behavioral problems. *Hum Mol Genet.* 2015;24:7171–7181.
71. Mills JA, Herrera PS, Kaur M, et al. NIPBL(±) haploinsufficiency reveals a constellation of transcriptome disruptions in the pluripotent and cardiac states. *Sci Rep.* 2018;8:1056.
72. Noh KM, Allis CD, Li H. Reading between the Lines: “ADD”-ing histone and DNA methylation marks toward a new epigenetic “sum”. *ACS Chem Biol.* 2016;11:554–563.
73. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, et al. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell.* 2010;140:678–691.
74. Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, et al. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet.* 2000;24:368.
75. Schenkel LC, Kernohan KD, McBride A, et al. Identification of epigenetic signature associated with alpha thalassemia/mental retardation X-linked syndrome. *Epigenetics Chromatin.* 2017;10:10.
76. Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616.
77. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19:128–139.

78. Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, et al. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: the role of the TGF-beta1 signaling pathway. *Int J Cardiol.* 2010;143:405–413.
79. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology.* 2006;118:10–24.
80. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407–411.
81. Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGFbeta signaling and disease. *FEBS Lett.* 2012;586:2003–2015.
82. Van Laer L, Dietz H, Loeys B. Loeys-Dietz syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:95–105.
83. Wheeler JB, Ikonomidis JS, Jones JA. Connective tissue disorders and cardiovascular complications: the indomitable role of transforming growth factor-beta signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:107–127.
84. Verheule S, Sato T, Everett T, et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res.* 2004;94:1458–1465.
85. Klein G, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, et al. Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKCepsilon. *Circ Res.* 2005;96:748–755.
86. Sun Y, Weber KT. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods Mol Med.* 2005;117:273–290.
87. Nyati S, Schinske-Sebolt K, Pitchiaya S, et al. The kinase activity of the Ser/Thr kinase BUB1 promotes TGF-beta signaling. *Sci Signal.* 2015;8:ra1.
88. Muto A, Ikeda S, Lopez-Burks ME, et al. Nipbl and mediator cooperatively regulate gene expression to control limb development. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004671.
89. Lopez-Burks ME, Santos R, Kawauchi S, et al. Genetic enhancement of limb defects in a mouse model of Cornelia de Lange syndrome. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 2016; 172:146–154.
90. Marston AL, Tham WH, Shah H, et al. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science (New York, NY).* 2004;303:1367–1370.
91. Mohr L, Buheitel J, Schöckel L, et al. An alternatively spliced bifunctional localization signal reprograms human Shugoshin 1 to protect centrosomal instead of centromeric cohesin. *Cell Rep.* 2015;12(12):2156–2168.
92. Wang X, Yang Y, Duan Q, et al. sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev Cell.* 2008;14:331–341.
93. Kang J, Chaudhary J, Dong H, et al. Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Mol Biol Cell.* 2011;22:1181–1190.
94. Jeyapragakash AA, Basquin C, Jayachandran U, et al. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Struct (London, England: 1993).* 2011;19: 1625–1634.
95. Xu Z, Cetin B, Anger M, et al. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Mol Cell.* 2009;35:426–441.
96. Deardorff MA, Wilde JJ, Albrecht M, et al. RAD21 mutations cause a human cohesinopathy. *Am J Hum Genet.* 2012;90:1014–1027.

97. Muto A, Calof AL, Lander AD, et al. Multifactorial origins of heart and gut defects in *nipbl*-deficient zebrafish, a model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Biol.* 2011;9:e1001181.
98. Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, et al. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* 2010;20:578–588.
99. Yamada HY, Yao Y, Wang X, et al. Haploinsufficiency of SGO1 results in deregulated centrosome dynamics, enhanced chromosomal instability and colon tumorigenesis. *Cell Cycle (georgetown, Tex).* 2012;11:479–488.
100. Indjeian VB, Stern BM, Murray AW. The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science (New York, NY).* 2005;307:130–133.
101. Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, et al. Human Sgo1 downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut.* 2009;58:249–260.
102. Kim MS, An CH, Yoo NJ, et al. Frameshift mutations of chromosome cohesion-related genes SGOL1 and PDS5B in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2013;44:2234–2240.
103. Wang LH, Yen CJ, Li TN, et al. Sgo1 is a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6:2023–2033.
104. Salic A, Waters JC, Mitchison TJ. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell.* 2004;118:567–578.
105. McGuinness BE, Hirota T, Kudo NR, et al. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 2005;3:e86.
106. Yamada HY, Zhang Y, Reddy A, et al. Tumor-promoting/progressing role of additional chromosome instability in hepatic carcinogenesis in Sgo1 (Shugoshin 1) haploinsufficient mice. *Carcinogenesis.* 2015;36:429–440.
107. Rao CV, Sanghera S, Zhang Y, et al. Antagonizing pathways leading to differential dynamics in colon carcinogenesis in Shugoshin1 (Sgo1)-haploinsufficient chromosome instability model. *Mol Carcinog.* 2016;55:600–610.
108. Rao CV, Farooqui M, Asch AS, et al. Critical role of mitosis in spontaneous late-onset Alzheimer's disease; from a Shugoshin 1 cohesinopathy mouse model. *Cell Cycle (georgetown, Tex).* 2018;17:2321–2334.
109. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;26:10129–10140.
110. Reiserer RS, Harrison FE, Syverud DC, et al. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 2007;6:54–65.
111. Chetelat G, La Joie R, Villain N, et al. Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. *NeuroImage Clin.* 2013;2:356–365.
112. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:135.
113. Song AT, Galli A, Leclerc S, et al. Characterization of Sgo1 expression in developing and adult mouse. *Gene Expression Patterns GEP.* 2017;25–26:36–45.
114. Song AT, Galli A, Leclerc S, et al. Dataset of Sgo1 expression in cardiac, gastrointestinal, hepatic and neuronal tissue in mouse. *Data Brief.* 2017;13:731–737.

115. Ogawa O, Zhu X, Lee HG, et al. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol.* 2003;105:524–528.
116. Rao CV, Farooqui M, Zhang Y, et al. Spontaneous development of Alzheimer's disease-associated brain pathology in a Shugoshin-1 mouse cohesinopathy model. *Aging Cell.* 2018;1717:e12797.
117. Mohan RA, Boukens BJ, Christoffels VM. Developmental origin of the Cardiac conduction system: insight from lineage tracing. *Pediatr Cardiol.* 2018;39:1107–1114.
118. van Eif VWW, Devalla HD, Boink GJJ, et al. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:617–630.
119. Wiese C, Grieskamp T, Airik R, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res.* 2009;104:388–397.
120. Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res.* 2007;100:354–362.
121. Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res.* 2006;72:271–281.
122. Boyett MR, Inada S, Yoo S, et al. Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol.* 2006;42:175–197.
123. Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, et al. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Nat Acad SciUSA.* 2003; 100:3507–3512.
124. Milanese R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, et al. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med.* 2006;354:151–157.
125. Benson DW, Wang DW, Dymant M, et al. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest.* 2003;112:1019–1028.
126. Locke GR 3rd, Ackerman MJ, Zinsmeister AR, et al. Gastrointestinal symptoms in families of patients with an SCN5A-encoded cardiac channelopathy: evidence of an intestinal channelopathy. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1299–1304.
127. Jung KT, Park H, Kim JH, et al. The relationship between gastric myoelectric activity and SCN5A mutation suggesting sodium channelopathy in patients with brugada syndrome and functional dyspepsia - A pilot study. *J Neurogastroenterol Motil.* 2012;18:58–63.
128. Verstraelen TE, Ter Bekke RM, Volders PG, et al. The role of the SCN5A-encoded channelopathy in irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterology Motil off J Eur Gastrointestinal Motil Soc.* 2015;27:906–913.
129. Saito YA, Strege PR, Tester DJ, et al. Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G211–8.
130. Yin J, Chen JD. Roles of interstitial cells of Cajal in regulating gastrointestinal motility: in vitro versus in vivo studies. *J Cell Mol Med.* 2008;12:1118–1129.
131. Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med.* 1998;4:848–851.
132. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, et al. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature.* 1995;373:347–349.

133. Der-Silaphet T, Malysz J, Hagel S, et al. Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology*. 1998;114:724–736.
134. Huizinga JD, Zhu Y, Ye J, et al. High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal. *Gastroenterology*. 2002;123:1627–1636.
135. Zhu Y, Golden CM, Ye J, et al. ERG K<sup>+</sup> currents regulate pacemaker activity in ICC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:G1249–58.
136. Yi T, Wong J, Feller E, et al. Electrophysiological mapping of embryonic mouse hearts: mechanisms for developmental pacemaker switch and internodal conduction pathway. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012;23:309–318.
137. Mery A, Aimond F, Menard C, et al. Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Mol Biol Cell*. 2005;16:2414–2423.
138. Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, et al. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*. 2002;277:19191–19197.
139. Huizinga JD, Chen JH, Zhu YF, et al. The origin of segmentation motor activity in the intestine. *Nat Commun*. 2014;5:3326.
140. Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech*. 1999;47:303–308.
141. Radenkovic G, Radenkovic D, Velickov A. Development of interstitial cells of Cajal in the human digestive tract as the result of reciprocal induction of mesenchymal and neural crest cells. *J Cell Mol Med*. 2018;22:778–785.
142. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, et al. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 2010;120:242–253.
143. Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, et al. Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ mouse embryos. *Development*. 1996;122:3023–3033.
144. Levkau B, Schafers M, Wohlschlaeger J, et al. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation*. 2008;117:1583–1593.
145. Schrickel JW, Lickfett L, Lewalter T, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of survivin causes global cardiac conduction defects. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:299.
146. Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. Survivin expression increases during aging and enhances the resistance of aged human fibroblasts to genotoxic stress. *Age (Dordr)*. 2013;35:549–562.
147. Kalman JM, Lee RJ, Fisher WG, et al. Radiofrequency catheter modification of sinus pacemaker function guided by intracardiac echocardiography. *Circulation*. 1995;92:3070–3081.
148. Euler DE, Jones SB, Gunnar WP, et al. Cardiac arrhythmias in the conscious dog after excision of the sinoatrial node and crista terminalis. *Circulation*. 1979;59:468–475.
149. Froese A, Breher SS, Waldeyer C, et al. Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *J Clin Invest*. 2012;122:1119–1130.



150. Andriani GA, Almeida VP, Faggioli F, et al. Whole Chromosome Instability induces senescence and promotes SASP. *Sci Rep.* 2016;6:35218.

Tables

Table 1. Summary of clinical characteristics of Cohesinopathies.

Cohesinopathies													
	CdLS (1-30)		CIPO (31)		RBS (32-35)	WABS (36-39)	ATRX (40-43)	CHOPS (44)	STAG2 (45-49)		CAID (50)		
	Dominant Mutation NIPBL	X-linked Dominant Mutation HDAC8	X-linked Dominant Mutation SMC1A	Dominant Mutation SMC3	Dominant Mutation RAD21	Recessive Mutation RAD21	Recessive Mutation ESCO2	Recessive Mutation DDX11	X-linked Recessive Mutation ATRX	De novo Dominant Mutation AFF4	X-linked Recessive Mutation STAG2	De novo Dominant Mutation STAG2	Recessive Mutation SGO1
Pathomecanism													
Function	Loss	Loss	Loss	Loss	Loss	Loss	Loss	Loss	Loss	Gain	Loss	Loss/Missence	Gain/Change?
Mental retardation	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Intellectual disabilities	Severe/ Moderate/ Mild	Severe/ Moderate/ Mild	Severe/ Moderate	Severe/ Moderate	Severe/Mild	-	Severe/Mild	Severe/ Mild	Severe/ Moderate/ Mild	+	Severe/ Moderate	Severe/ Moderate	-
Speech and language	+	+	+/-	-	+/-	-	+/-	+	+	-	-	+	-
Psychomotor retardations	+	+	+	-	+/-	-	+/-	+	+	-	-	-	-
Behavior and neurological problems	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	+	-
Self-injurious behavior	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Attention deficit disorder	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-
Epilepsy	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Hyperactivity	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-
Autism	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Aneurysm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Growth/Developmental anomalies (pre- and postnatal)	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Growth retardation	+	+/-	+/-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Short stature	+	+/-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-	-
Skeletal anomalies	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	-	+	+	-	+/-	-
Limb malformations	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	+	-	+	-
Upper limb truncations	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lower limb truncations	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Small extremities/ Brachydactyly	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	+	-	-	-

<b>Craniofacial anomalies</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Microcephaly	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+	+	+	+/-	-	+	-
Brachycephaly	-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
Proeminent eyes	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	+	-	-
Spaced eyes	+/-	+/-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+/-	-
Arched eyebrows	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Synophrys	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Long eyelashes	+	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-
Low-set ears	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+	-	-	+/-	-
Upturned nose/nostrils	+	+	+	+	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-
Nasal bridge anomalies	+	+/-	+	+	+	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-
Micrognathia	+	+	+	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-
Philtrum anomalies	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	-
Thin upper lip	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+/-	-
Downturn mouth	+	+	+	+	-	-	+/-	-	+	+/-	-	-	-
Widely spaced teeth	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
Palate anomalies	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+/-	+/-	+	+	-
Cleft lip	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-
Low posterior or anterior hairline	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
Frontal baldness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hirsutism	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Vision defects</b>	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-
Cataracts	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
Myopia	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
Ptosis	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glaucoma	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ear defects</b>	+	+	+/-	+	+/-	-	-	+	+/-	+/-	+	+	-
Hearing loss	+	+	+/-	+	+/-	-	-	+	+/-	+/-	+	+/-	-
<b>Genitalia defects</b>	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Hypoplasia	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
Microphallus	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
Enlarged phallus	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
Undescended testes	+/-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Hypospadia	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
<b>Gastrointestinal defects</b>	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+	-	-	+
Gastroesophageal reflux disease	+	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+	-	-	-
Constipation	-	-	+/-	-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+
Chronic intestinal pseudo-obstruction	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Feeding difficulties	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+

<b>Heart defects</b>	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	+/-	+
Atrial septal defect	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
Ventricular septal defect	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	+/-	-
Atrial dysrhythmia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sick sinus syndrome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Valves anomalies	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+
Patent ductus arteriosus	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-
Tetralogy of Fallot (TOF)	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
Congenital heart disease	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-
<b>Blood disorders</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
$\alpha$ -Thalassemia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fanconi Anemia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Legend: +: present in most cases, +/-: present in certain cases, -: not present or not specified.

## Table references

1. Liu J, Krantz ID. Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clinical genetics* 2009; 76:303-14.
2. Jackson L, Kline AD, Barr MA, Koch S. de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals. *American journal of medical genetics* 1993; 47:940-6.
3. Kline AD, Grados M, Sponseller P, Levy HP, Blagowidow N, Schoedel C, Rampolla J, Clemens DK, Krantz I, Kimball A, et al. Natural history of aging in Cornelia de Lange syndrome. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 2007; 145c:248-60.
4. Tsukahara M, Okamoto N, Ohashi H, Kuwajima K, Kondo I, Sugie H, Nagai T, Naritomi K, Hasegawa T, Fukushima Y, et al. Brachmann-de Lange syndrome and congenital heart disease. *American journal of medical genetics* 1998; 75:441-2.
5. Selicorni A, Sforzini C, Milani D, Cagnoli G, Fossali E, Bianchetti MG. Anomalies of the kidney and urinary tract are common in de Lange syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 2005; 132a:395-7.
6. Berney TP, Ireland M, Burn J. Behavioural phenotype of Cornelia de Lange syndrome. *Archives of disease in childhood* 1999; 81:333-6.
7. Hyman P, Oliver C, Hall S. Self-injurious behavior, self-restraint, and compulsive behaviors in Cornelia de Lange syndrome. *American journal of mental retardation : AJMR* 2002; 107:146-54.
8. Kaga K, Tamai F, Kitazumi E, Kodama K. Auditory brainstem responses in children with Cornelia de Lange syndrome. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 1995; 31:137-46.
9. Wygnanski-Jaffe T, Shin J, Perruzza E, Abdoell M, Jackson LG, Levin AV. Ophthalmologic findings in the Cornelia de Lange Syndrome. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 2005; 9:407-15.
10. Roposch A, Bhaskar AR, Lee F, Adedapo S, Mousny M, Alman BA. Orthopaedic manifestations of Brachmann-de Lange syndrome: a report of 34 patients. *Journal of pediatric orthopedics Part B* 2004; 13:118-22.
11. Boyle MI, Jespersgaard C, Brondum-Nielsen K, Bisgaard AM, Tumer Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clinical genetics* 2015; 88:1-12.
12. Ansari M, Poke G, Ferry Q, Williamson K, Aldridge R, Meynert AM, Bengani H, Chan CY, Kayserili H, Avci S, et al. Genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome (CdLS) and CdLS-like phenotypes with observed and predicted levels of mosaicism. *Journal of medical genetics* 2014; 51:659-68.
13. Chatfield KC, Schrier SA, Li J, Clark D, Kaur M, Kline AD, Deardorff MA, Jackson LS, Goldmuntz E, Krantz ID. Congenital heart disease in Cornelia de Lange syndrome: phenotype and genotype analysis. *American journal of medical genetics Part A* 2012; 158a:2499-505.
14. Luzzani S, Macchini F, Valade A, Milani D, Selicorni A. Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. *American journal of medical genetics Part A* 2003; 119a:283-7.
15. Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, Ishman SL, Kerr LM, Levin AV, Mulder PA, et al. Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nature reviews Genetics* 2018; 19:649-66.
16. Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukofsky L, Wasserman N, Bottani A, Morris CA, et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature genetics* 2004; 36:631-5.
17. Gillis LA, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, Kline AD, Li HH, Devoto M, Jackson LG, et al. NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome

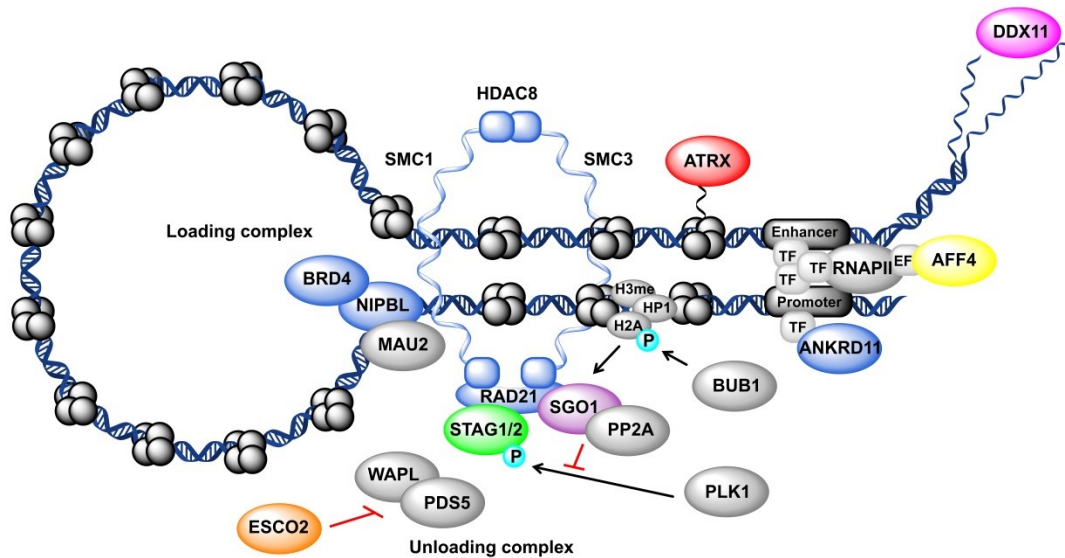
- and evaluation of genotype-phenotype correlations. *American journal of human genetics* 2004; 75:610-23.
18. Bhuiyan ZA, Klein M, Hammond P, van Haeringen A, Mannens MM, Van Berckelaer-Onnes I, Hennekam RC. Genotype-phenotype correlations of 39 patients with Cornelia De Lange syndrome: the Dutch experience. *Journal of medical genetics* 2006; 43:568-75.
  19. Selicorni A, Russo S, Gervasini C, Castronovo P, Milani D, Cavalleri F, Bentivegna A, Masciadri M, Domi A, Divizia MT, et al. Clinical score of 62 Italian patients with Cornelia de Lange syndrome and correlations with the presence and type of NIPBL mutation. *Clinical genetics* 2007; 72:98-108.
  20. Yan J, Saifi GM, Wierzba TH, Withers M, Bien-Willner GA, Limon J, Stankiewicz P, Lupski JR, Wierzba J. Mutational and genotype-phenotype correlation analyses in 28 Polish patients with Cornelia de Lange syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 2006; 140:1531-41.
  21. Kaiser FJ, Ansari M, Braunholz D, Concepcion Gil-Rodriguez M, Decroos C, Wilde JJ, Fincher CT, Kaur M, Bando M, Amor DJ, et al. Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features, ocular hypertelorism, large fontanelle and X-linked inheritance. *Human molecular genetics* 2014; 23:2888-900.
  22. Harakalova M, van den Boogaard MJ, Sinke R, van Lieshout S, van Tuil MC, Duran K, Renkens I, Terhal PA, de Kovel C, Nijman IJ, et al. X-exome sequencing identifies a HDAC8 variant in a large pedigree with X-linked intellectual disability, truncal obesity, gynaecomastia, hypogonadism and unusual face. *Journal of medical genetics* 2012; 49:539-43.
  23. Musio A, Selicorni A, Focarelli ML, Gervasini C, Milani D, Russo S, Vezzoni P, Larizza L. X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nature genetics* 2006; 38:528-30.
  24. Borck G, Zarhrate M, Bonnefont JP, Munnich A, Cormier-Daire V, Colleaux L. Incidence and clinical features of X-linked Cornelia de Lange syndrome due to SMC1L1 mutations. *Human mutation* 2007; 28:205-6.
  25. Huisman S, Mulder PA, Redeker E, Bader I, Bisgaard AM, Brooks A, Cereda A, Cinca C, Clark D, Cormier-Daire V, et al. Phenotypes and genotypes in individuals with SMC1A variants. *American journal of medical genetics Part A* 2017; 173:2108-25.
  26. Hoppman-Chaney N, Jang JS, Jen J, Babovic-Vuksanovic D, Hodge JC. In-frame multi-exon deletion of SMC1A in a severely affected female with Cornelia de Lange Syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 2012; 158a:193-8.
  27. Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodriguez C, Arnedo M, Loeys B, Kline AD, et al. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *American journal of human genetics* 2007; 80:485-94.
  28. Gil-Rodriguez MC, Deardorff MA, Ansari M, Tan CA, Parenti I, Baquero-Montoya C, Ousager LB, Puisac B, Hernandez-Marcos M, Teresa-Rodrigo ME, et al. De novo heterozygous mutations in SMC3 cause a range of Cornelia de Lange syndrome-overlapping phenotypes. *Human mutation* 2015; 36:454-62.
  29. Deardorff MA, Wilde JJ, Albrecht M, Dickinson E, Tennstedt S, Braunholz D, Monnich M, Yan Y, Xu W, Gil-Rodriguez MC, et al. RAD21 mutations cause a human cohesinopathy. *American journal of human genetics* 2012; 90:1014-27.
  30. Ayerza Casas A, Puisac Uriol B, Teresa Rodrigo ME, Hernandez Marcos M, Ramos Fuentes FJ, Pie Juste J. Cornelia de Lange syndrome: Congenital heart disease in 149 patients. *Medicina clinica* 2017; 149:300-2.
  31. Bonora E, Bianco F, Cordeddu L, Bamshad M, Francescatto L, Dowless D, Stanghellini V, Cogliandro RF, Lindberg G, Mungan Z, et al. Mutations in RAD21 disrupt regulation of APOB in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology* 2015; 148:771-82.e11.

32. Gordillo M, Vega H, Jabs EW. Roberts Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, et al., eds. GeneReviews(R). Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved., 1993.
33. Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nature genetics* 2005; 37:468-70.
34. Schule B, Oviedo A, Johnston K, Pai S, Francke U. Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. *American journal of human genetics* 2005; 77:1117-28.
35. Vega H, Trainer AH, Gordillo M, Crosier M, Kayserili H, Skovby F, Uzielli ML, Schnur RE, Manouvrier S, Blair E, et al. Phenotypic variability in 49 cases of ESCO2 mutations, including novel missense and codon deletion in the acetyltransferase domain, correlates with ESCO2 expression and establishes the clinical criteria for Roberts syndrome. *Journal of medical genetics* 2010; 47:30-7.
36. van der Lelij P, Chrzanowska KH, Godthelp BC, Rooimans MA, Oostra AB, Stumm M, Zdzienicka MZ, Joenje H, de Winter JP. Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChlR1. *American journal of human genetics* 2010; 86:262-6.
37. Capo-Chichi JM, Bharti SK, Sommers JA, Yammine T, Chouery E, Patry L, Rouleau GA, Samuels ME, Hamdan FF, Michaud JL, et al. Identification and biochemical characterization of a novel mutation in DDX11 causing Warsaw breakage syndrome. *Human mutation* 2013; 34:103-7.
38. Alkhunaizi E, Shaheen R, Bharti SK, Joseph-George AM, Chong K, Abdel-Salam GMH, Alowain M, Blaser SI, Papsin BC, Butt M, et al. Warsaw breakage syndrome: Further clinical and genetic delineation. *American journal of medical genetics Part A* 2018; 176:2404-18.
39. Chang S, Gordillo M, Jabs EW, Vega H, Uzielli MLG, Schnur RE, Manouvrier S, Blair E, Hurst JA, Forzano F, et al. The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. *Human molecular genetics* 2008; 17:2172-80.
40. Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AO, Buckle VJ, Higgs DR. X-linked alpha-thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. *American journal of human genetics* 1992; 51:1136-49.
41. Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 1995; 80:837-45.
42. Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet journal of rare diseases* 2006; 1:15.
43. Martucciello G, Lombardi L, Savasta S, Gibbons RJ. Gastrointestinal phenotype of ATR-X syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 2006; 140:1172-6.
44. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K. Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. 2015; 47:338-44.
45. Soardi FC, Machado-Silva A, Linhares ND, Zheng G, Qu Q, Pena HB, Martins TMM, Vieira HGS, Pereira NB, Melo-Minardi RC, et al. Familial STAG2 germline mutation defines a new human cohesinopathy. *NPJ genomic medicine* 2017; 2:7.
46. Mullegama SV, Klein SD, Mulatinho MV, Senaratne TN, Singh K, Nguyen DC, Gallant NM, Strom SP, Ghahremani S, Rao NP, et al. De novo loss-of-function variants in STAG2 are associated with developmental delay, microcephaly, and congenital anomalies. *American journal of medical genetics Part A* 2017; 173:1319-27.

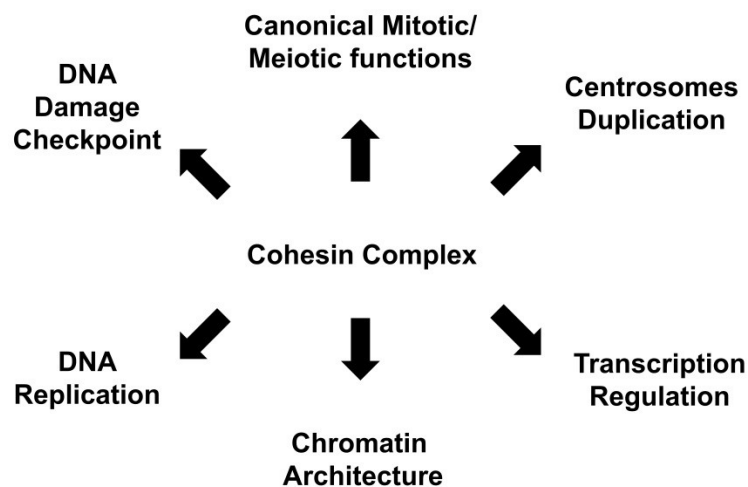
47. Mullegama SV, Klein SD, Signer RH, Vilain E, Martinez-Agosto JA. Mutations in STAG2 cause an X-linked cohesinopathy associated with undergrowth, developmental delay, and dysmorphism: Expanding the phenotype in males. *Molecular genetics & genomic medicine* 2019; 7:e00501.
48. Yuan B, Neira J, Pehlivan D, Santiago-Sim T, Song X, Rosenfeld J, Posey JE, Patel V, Jin W, Adam MP, et al. Clinical exome sequencing reveals locus heterogeneity and phenotypic variability of cohesinopathies. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2019; 21:663-75.
49. Aoi H, Lei M, Mizuguchi T, Nishioka N, Goto T, Miyama S, Suzuki T, Iwama K, Uchiyama Y, Mitsuhashi S, et al. Nonsense variants in STAG2 result in distinct sex-dependent phenotypes. *Journal of human genetics* 2019.
50. Chetaille P, Preuss C, Burkhard S, Cote JM, Houde C, Castilloux J, Piche J, Gosset N, Leclerc S, Wunnemann F, et al. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *Nature genetics* 2014; 46:1245-9.



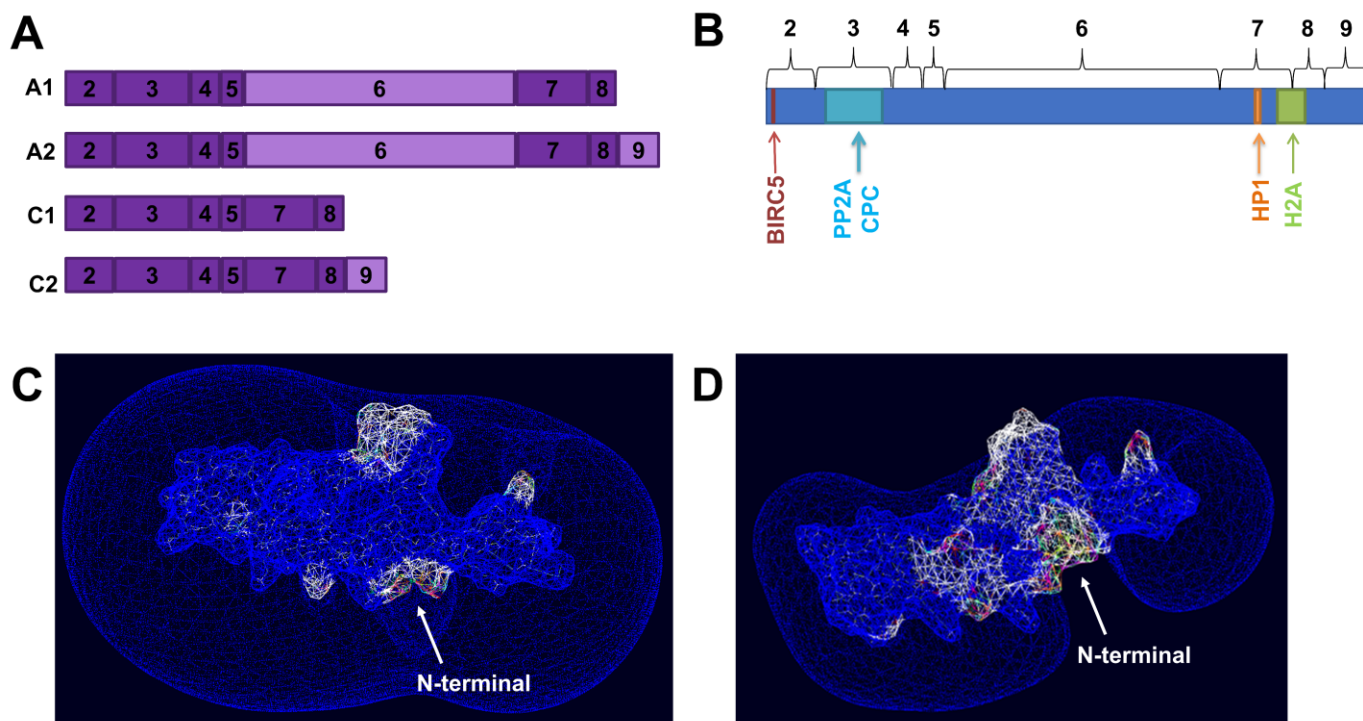
## Figures



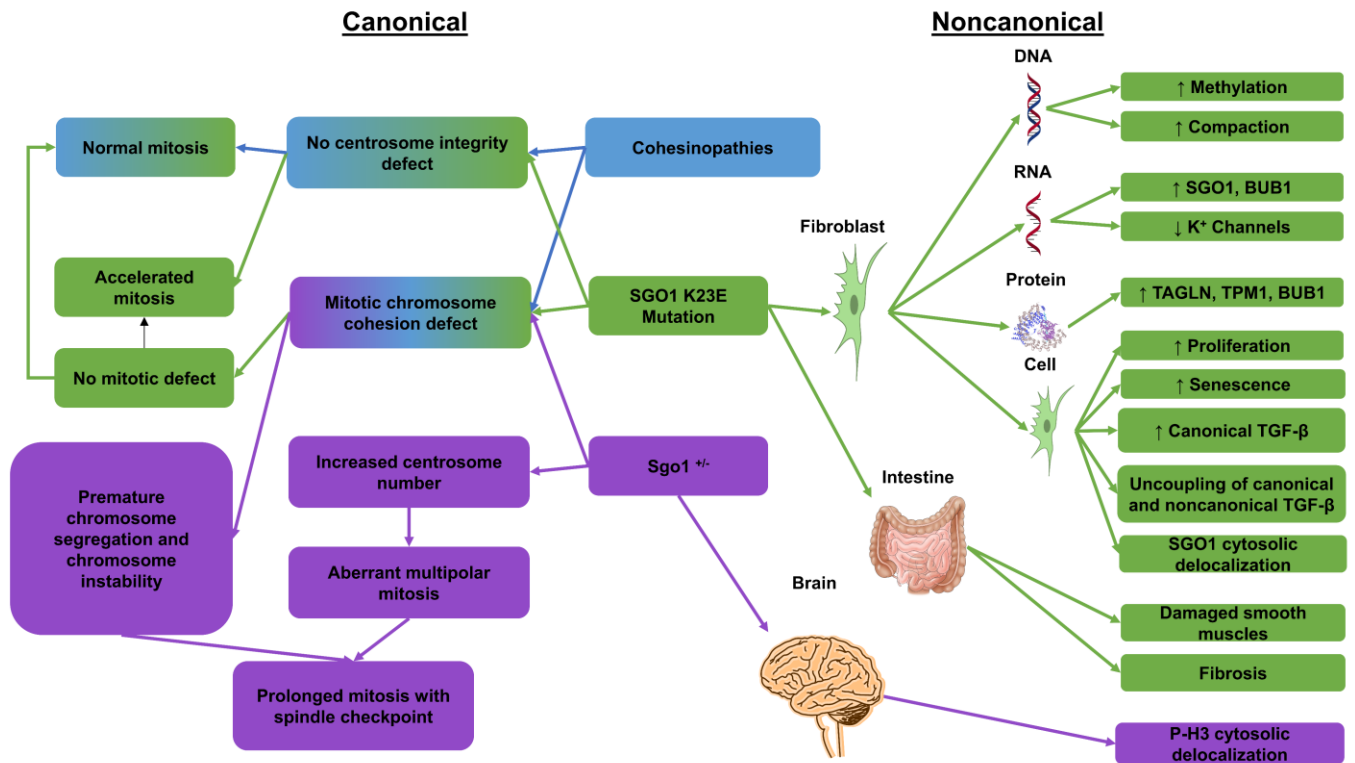
**Figure 1. Components (SMC1, SMC3, RAD21, and STAG1/2) and partners of the cohesin complex.** Colors indicate proteins whose mutated forms are involved in cohesinopathies. Blue: CdLS (NIPBL, HDAC8, SMC1A, SMC3, RAD21, BRD4, ANKRD11), Orange: RBS (ESCO2), Pink: WABS (DDX11), Red: ATRX (ATRX), Yellow: CHOPS (AFF4), Green: STAG2-related X-linked Intellectual Deficiency (STAG2) and Purple: CAID syndrome (SGO1).



**Figure 2. Functions of the cohesin complex in cohesion and in non-cohesion-related mechanisms.**



**Figure 3. Representations of SGO1.** (a) Schematic representation of SGO1 isoforms. (b) Schematic structure of SGO1 (isoform A2) and binding sites. Numbers refer to SGO1 exons. In silico 3D reconstruction and electronic cloud of (c) the native SGO1 protein (d) the K23E mutated SGO1 protein. I-TASSER server was used for protein structure and function prediction. The K23E mutation alters the 3D configuration and the electronic cloud in the N-terminal region.



**Figure 4. Comparison of the canonical and noncanonical findings of SGO1 K23E mutation with SGO1 haploinsufficiency in mice and other cohesinopathies to highlight the differences between each condition.** Blue: Cohesinopathies. Green: CAID syndrome (SGO1 K23E mutation). Purple: Sgo1<sup>±</sup> mice. Direct findings are indicated by arrows.

## Chapitre 4: Article 2

### **Molecular signature of CAID syndrome: non-canonical roles of SGO1 in regulation of TGF- $\beta$ signaling and epigenomics**

**Statut de la publication :** Article publié en ligne le 24 octobre 2018. Publié dans le journal Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology (CMGH), 2019;7(2):411-431.

**Short Title:** Noncanonical roles of SGO1 in CAID syndrome

**Author(s):** Jessica Piché<sup>1</sup>, Natacha Gosset<sup>1</sup>, Lisa-Marie Legault<sup>2</sup>, Alain Pacis<sup>3</sup>, Andrea Oneglia<sup>1</sup>, Maxime Caron<sup>4</sup>, Philippe Chetaille<sup>5</sup>, Luis Barreiro<sup>3,6</sup>, Donghai Liu<sup>7</sup>, Xiaoyan Qi<sup>7</sup>, Stanley Nattel<sup>7</sup>, Séverine Leclerc<sup>1</sup>, Mélanie Breton-Larrivée<sup>2</sup>, CoHEART consortium, Serge McGraw<sup>2,8</sup>, Gregor Andelfinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cardiovascular Genetics, Department of Pediatrics, CHU Sainte Justine Research Center, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine, CHU Sainte Justine Research Center Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup> Department of Genetics, CHU Sainte Justine Research Center; Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>4</sup> CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, Canada

<sup>5</sup> Service of Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, Centre Mère Enfants Soleil, Centre Hospitalier de l'Université (CHU) de Québec, Québec City, Québec, Canada.

<sup>6</sup> Department of Genetics, CHU Sainte Justine Research Center, Montreal, Quebec, Canada.; Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>7</sup> Research Center, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>8</sup> Departement of Obstetrics and Gynecology, CHU Sainte Justine Research Center, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

**Grant support:** J.P. is a recipient doctoral awards of the FRQS, the Foundation GO and FESP. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research Project Grant 366129

and by the E-RARE CoHEART consortium. S.McG. was supported as Chercheur-boursier Junior 1 by the FRQS. G.A. was supported as Chercheur-boursier Senior by the FRQS and holds the Banque Nationale Chaire de Recherche en Génétique Cardiovasculaire.

**Author Contributions:** Jessica Piché and Gregor Andelfinger designed the study and wrote the paper; Gregor Andelfinger supervised the study and obtained funding; Philippe Chetaille obtained critical patient material; Jessica Piché, Natacha Gosset, Lisa-Marie Legault, Alain Pacis, Andrea Oneglia, Maxime Caron, Donghai Liu, Xioyan Qi, Mélanie Breton-Larrivée, and Séverine Leclerc provided technical support, performed experiments, and acquired or analyzed data; Serge McGraw, Luis Barreiro, and Stanley Nattel analyzed and interpreted data; and the CoHEART consortium provided critical revision.

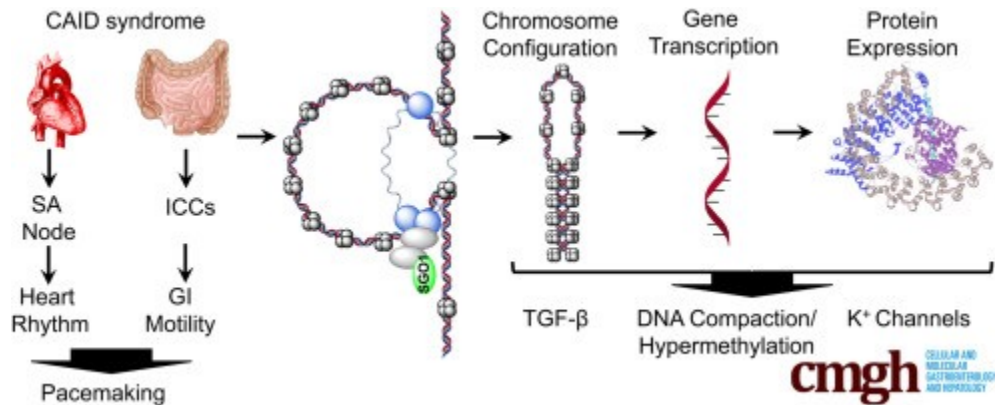
Transcript profiling and genomics data are as follows: repository URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; SuperSeries [GSE110612](#) was composed of the following subseries: [GSE110309](#), [GSE110576](#), and [GSE110601](#).

**Keywords:** CAID syndrome (chronic atrial and intestinal dysrhythmia), chronic intestinal pseudo-obstruction, TGF- $\beta$  signaling, epigenetics

**Abbreviations used in this paper:** ATAC, assay for transposase-accessible chromatin with high throughput; CAID, chronic atrial and intestinal dysrhythmia; CIPO, chronic intestinal pseudo-obstruction; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FDR, false discovery rate; GO, Gene Ontology; IK1, inward rectifying potassium current; JNK, c-Jun-N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mRNA, messenger RNA; p, passage number; PCR, polymerase chain reaction; RMP, resting membrane potential; RRBS, reduced representative bisulfite sequencing; SILAC, stable isotope labeling by amino acids in cell culture; TAGLN, Transgelin; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; TPM, tropomyosin.

**Synopsis:** CAID syndrome is a genetic disease, in which failure of pacemakers in the entire human body leads to loss of all bowel movements. We here identify unknown mechanisms, by which CAID syndrome causes this intestinal disease.

### Graphical abstract



## Contributions détaillées des co-auteurs

Le syndrome CAID a été découvert par le Dr Philippe Chetaille.

### Lignées cellulaires

Les biopsies ont été effectuées par le Dr Andelfinger. La culture primaire des biopsies et leur maintenance pour la bio banque du laboratoire ont été assurées par **Jessica Piché**, Natacha Gosset et Séverine Leclerc.

### Études de transcriptomique

*Culture cellulaire.* 6 lignées contrôles et 6 lignées homozygotes ont été cultivées en parallèle par **Jessica Piché** du passage 2 au passage 14 (~ 3 mois de culture). À chaque passage, des cellules ont été gardées pour extraire l'ARN et les protéines pour les validations subséquentes.

*Extraction de l'ARN.* Les extractions d'ARN pour les passages 8 et 14 ont été faites par **Jessica Piché** à l'aide d'un appareil QIACube automatisé. Les contrôles de qualité par bioanalyzer ont aussi été faits par **Jessica Piché**.

*Préparation des librairies.* Les librairies ont été générées par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill par souci de standardisation.

*Séquençage des librairies.* Les librairies ont été séquencées par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

*Traitement des données et analyses bio informatiques.* Les contrôles de qualité, la suppression des adaptateurs et l'alignement au génome de référence ont été faits par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Toute l'analyse des données (comptage des lectures, transformation, normalisation, analyses de l'expression différentielle et analyse statistique) a été faite par **Jessica Piché**. Alain Pacis, supervisé par Dr Luis Barreiro, a refait quelques analyses de manière indépendante pour valider les résultats obtenus et, en collaboration avec **Jessica Piché**, a mis en place le modèle linéaire final: Expression génique ~ Sexe + Age\_Biopsie + Génotype: Passage. Ainsi, 3 contrôles et 3 homozygotes ont été conservés pour l'analyse, et pour les expériences subséquentes. Les analyses d'ontologie génétique (Metascape, String10) ainsi que la mise en évidence de candidats et de voies de signalisation d'intérêt ont été faites par **Jessica Piché**.

*Validation par qPCR* (Quantitative Polymerase Chain Reaction). Les validations par qPCR ont été planifiées par **Jessica Piché** et faites par Andrea Oneglia sur les ARN précédemment extrait par **Jessica Piché**.

*Figures 1 et 2, tableaux 1, 2 et 9.* L'ensemble des graphiques et schémas d'interaction des figures a été généré et assemblé par **Jessica Piché**. Les tests statistiques ont aussi été faits par Jessica Piché. Les tableaux ont été faits par **Jessica Piché**.

*Commentaires.* L'expérience de RNAseq a été conduite deux fois (par **Jessica Piché**) dû à un impact important de l'âge (néonataux vs enfants/adultes) et de l'ethnicité (Caucasienne vs Canadienne-française) des contrôles au cours de la première expérience.

### **Études de protéomiques**

*Culture cellulaire et marquage avec des isotopes stables.* 3 lignées contrôles et 3 lignées homozygotes ont été cultivées en parallèle dans le milieu contenant les isotopes stables (contrôles : isotopes légers, homozygotes : isotopes lourds) par **Jessica Piché** du passage 2 au passage 14 (~ 3 mois de culture). À chaque passage, des cellules ont été gardées pour extraire les protéines pour les validations subséquentes.

*Lyse cellulaire et digestion.* Les cellules ont été préparées par **Jessica Piché** pour la lyse cellulaire et la digestion qui ont été faites par la plateforme de protéomique de l'IRIC.

*Dessalage, concentration et spectrométrie de masse.* Ces étapes ont été effectuées par la plateforme de protéomique de l'IRIC.

*Traitement des données et analyses bio informatiques.* Le traitement des données avec Maxquant a été fait conjointement par **Jessica Piché** et la plateforme de protéomique de l'IRIC. Les analyses d'expression différentielle, d'ontologie génétique (Metascape, String10) ainsi que la mise en évidence de candidats et de voies de signalisation d'intérêt ont été faites par **Jessica Piché**.

*Validations par immunobuvardage de type western.* L'extraction des protéines, le dosage, les immunobuvardages de type western et la quantification des images ont été faits par **Jessica Piché**.

*Figure 3, tableaux 3 et 4.* L'ensemble des graphiques et schémas d'interaction de la figure a été généré et assemblé par **Jessica Piché**. Les tests statistiques pour la signifiante de l'expression différentielle ont aussi été faits par **Jessica Piché**. Les tableaux ont été faits par Jessica Piché.



*Commentaires.* L'expérience de SILAC a été conduite deux fois (par **Jessica Piché**) dû à l'incapacité des lignées homozygotes à incorporer les isotopes lourds. Le design a dû être inversé et les cellules cultivées à nouveau.

### **Études sur les tissus**

*Immunohistologie de l'intestin.* La coupe des tissus en paraffine a été faite par Séverine Leclerc. La planification, l'immunohistologie, l'imagerie par microscopie, le traitement et l'interprétation des images ont été faits par **Jessica Piché**.

*Figures 4 et 5.* Toutes les images ont été traitées et assemblées par Jessica Piché.

### **Essais de culture cellulaire**

*Électrophysiologie.* La culture des cellules a été faite par **Jessica Piché**. **Jessica Piché** a assuré le transport des cellules à l'institut de cardiologie de Montréal où l'électrophysiologie a été faite dans le laboratoire du Dr Stan Nattel par Xiaoyan Qi et Donghai Liu avec la participation de **Jessica Piché**. L'analyse des résultats et l'analyse statistique ont été faits par Xiaoyan Qi.

*Figure 6 A à E.* Les graphiques ont été générés par Xiaoyan Qi. L'assemblage a été fait par **Jessica Piché**.

*Caractérisation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ .* L'expérience a été planifiée par **Jessica Piché**, Natacha Gosset, et Dr. Andelfinger. La culture cellulaire, les «alpha-screens», le traitement des résultats et l'analyse statistique ont été faits par Natacha Gosset. L'analyse a été refaite de façon indépendante par **Jessica Piché** pour la publication de l'article.

*Figure 6F à G.* Tous les graphiques et l'assemblage ont été faits par **Jessica Piché**.

### **Études épigénétiques**

*Préparation des librairies et RRBS.* 6 lignées contrôles et 6 lignées homozygotes ont été cultivées en parallèle par **Jessica Piché** du passage 2 au passage 14 (~ 3 mois de culture). L'extraction de l'ADN a été faite par **Jessica Piché**. La préparation des librairies (digestion, réparation des extrémités, ajout de la queue poly-A, ligation des adaptateurs, conversion bisulfite, amplification et indexation finale) a été faite par Lisa-Marie Legault et **Jessica Piché** sous la supervision de Dr Serge McGraw. Le séquençage des librairies a été fait par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

*Traitement et analyse des données de RRBS.* Le développement et la mise en place du pipeline d'analyse ainsi que le prétraitement des données (fusion des réplicats de séquençage) ont été

faits par Maxime Caron. L'analyse brute des données (contrôles de qualité, alignement au génome de référence, valeurs de méthylation et analyse statistique) a été faite par Lisa-Marie Legault. L'identification des régions différenciellement méthylées et les analyses statistiques ont été faites par Lisa-Marie Legault et refaites de manière indépendante par Alain Pacis pour valider les résultats obtenus. L'application du modèle linéaire : Méthylation  $\sim$  Sexe + Age\_Biopsie + Génotype: Passage a été faite par Alain Pacis. L'analyse des valeurs de méthylation, de l'ontologie génétique (Metascape) ainsi que la mise en évidence de candidats et de voies de signalisation d'intérêt ont été faites par **Jessica Piché**.

*Pyroséquençage LINE-1.* La conversion bisulfite et l'enrichissement pour les séquences LINE-1 ont été faits par Mélanie Breton-Larrivée sur l'ADN précédemment extrait par **Jessica Piché** pour le RRBS. Le séquençage a été fait par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. L'analyse des résultats a été faite par **Jessica Piché**.

*Préparation des librairies et ATAC-seq.* 6 lignées contrôles et 6 lignées homozygotes ont été cultivées en parallèle par **Jessica Piché** du passage 2 au passage 14 (~ 3 mois de culture). La préparation des librairies ainsi que les contrôles de qualité par bioanalyser ont été faits par **Jessica Piché**. Le séquençage a été fait par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

*Traitement et analyse des données d'ATAC-seq.* Le traitement bio-informatique des données a été fait conjointement par **Jessica Piché** (suppression des adaptateurs et des bases de faible score de qualité, alignement au génome de référence, suppression des duplicatas PCR, identification des pics) et Alain Pacis (fusion des pics provenant d'un même échantillon, quantification des pics combinés, normalisation, transformation). L'application du modèle linéaire : Accessibilité de la chromatine  $\sim$  Sexe + Age\_Biopsie + Génotype: Passage a été faite par Alain Pacis. L'analyse de l'ouverture/fermeture de la chromatine, de l'ontologie génétique (Metascape) ainsi que la mise en évidence de candidats et de voies de signalisation d'intérêt ont été faites par **Jessica Piché**.

*Figure 7 et tableaux 5, 6, 7, et 10.* Tous les graphiques ont été générés par **Jessica Piché**. Les «heatmaps» ont été planifiés par **Jessica Piché**, et ont été générés par Alain Pacis. L'assemblage de la figure a été fait par Jessica Piché. Les tableaux ont été faits par **Jessica Piché**.

*Commentaires.* L'ATAC-seq a dû être répété trois fois (par **Jessica Piché**) avant d'obtenir des résultats concluants. La première fois, le nombre de duplicatas PCR était trop élevé dû à la

difficulté de lyser les cellules et à libérer l'ADN. La deuxième fois, le double de cellules ainsi que le double d'enzyme Tn5 ont été utilisés afin d'extraire et de fragmenter une quantité d'ADN plus importante pour éviter le problème des duplicatas PCR, mais sans succès. La troisième fois, un protocole de lyse différent utilisant 2 lyses consécutives avec 2 tampons de lyse de composition différente a été utilisé avec succès.

## Abstract

**Background and aims:** A generalized human pacemaking syndrome, CAID (chronic atrial and intestinal dysrhythmia) syndrome (OMIM 616201) is caused by a homozygous *SGO1* (Shugoshin-1) mutation (K23E), leading to chronic intestinal pseudo-obstruction and arrhythmias. Since CAID patients do not exhibit phenotypes consistent with perturbation of known roles of SGO1, we hypothesized that noncanonical roles of SGO1 drive the clinical manifestations observed.

**Methods:** To identify a molecular signature for CAID syndrome, we achieved unbiased screens in cell lines and gut tissues from CAID patients versus wildtype controls. We performed RNA sequencing along with stable isotope labeling with amino acids in cell culture. In addition, we determined the genome-wide DNA methylation and chromatin accessibility signatures using reduced representative bisulfite sequencing and assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing. Functional studies included patch-clamp, quantitation of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling and immunohistochemistry in CAID patient gut biopsy specimens.

**Results:** Proteome and transcriptome studies converge on cell-cycle regulation, cardiac conduction and smooth muscle regulation as drivers of CAID syndrome. Specifically, the inward rectifier current, an important regulator of cellular function, was disrupted. Immunohistochemistry confirmed overexpression of Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 (*BUB1*) in patients, implicating the TGF- $\beta$  pathway in CAID pathogenesis. Canonical TGF- $\beta$  signaling was upregulated and uncoupled from noncanonical signaling in CAID patients. Reduced representative bisulfite sequencing and assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing experiments showed significant changes of chromatin states in CAID, pointing to epigenetic regulation as a possible pathologic mechanism.

**Conclusions:** Our findings point to impaired inward rectifier potassium current, dysregulation of canonical TGF- $\beta$  signaling, and epigenetic regulation as potential drivers of intestinal and cardiac manifestations of CAID syndrome.

## Introduction

Lifelong rhythmic contractions are the hallmark of the human heart and gut. Both organs contain pacemaker cells that spontaneously can generate an action potential through a shared polarization mechanism involving ion channels. In the heart, the sinoatrial node is responsible for this mechanism, whereas in the gut, the network of interstitial cells of Cajal and the autonomous enteric nervous system depolarize the myocytes and allow the induction of electric signals.

Disorders of pacemaking are a major cause of gastrointestinal and cardiac diseases. Chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO) is a rare and severe disorder of gastrointestinal motility in which intestinal obstruction occurs in the absence of a mechanical obstacle. CIPO is one of the most important causes of intestinal insufficiency in pediatric (15%) and adult cases (20%) (1-3). CIPO can result from the insufficiency of pacemaker cells and the enteric nervous system to generate or propagate electric signals and stimulate subsequent contraction of the smooth muscles, leading to contraction defects (neurogenic CIPO). It can also result from primary smooth muscle contraction defects (myogenic CIPO). CIPO is a devastating and life-long disease that often requires surgical intestinal decompression as well as total parenteral nutrition. Even though X-linked, autosomal dominant and recessive mutations have been identified in *FLNA*, *ACTG2*, *TYMP*, *POLG1* and *RAD21*, most cases are sporadic and leave causes and pathomechanisms of CIPO poorly defined (4-8).

We have recently identified a generalized human pacemaking syndrome, encompassing both gastrointestinal and cardiac dysrhythmias. We have termed this condition *chronic atrial and intestinal dysrhythmia* (CAID) syndrome (OMIM 616201). We identified a recessive point mutation in the cohesion regulator *SGO1*, namely K23E, as the cause of CAID syndrome (3). CAID patients appeared normal at birth, and no patient had any other congenital anomalies. Gastrointestinal symptoms usually preceded cardiac symptoms. In different individuals with CAID, CIPO was found to be of neurogenic, myogenic or mixed origin (3). Representative manometries of CAID patients showed visceral neuropathy with abnormal response to intravenous erythromycin and colonic manometries showed visceral myopathy with low-amplitude propagated contractions after stimulation (3). Gastrointestinal symptoms were also the main determinant of morbidity and mortality.

Karyotypes in affected individuals showed the typical railroad appearance of a centromeric cohesion defect, identifying CAID as a novel cohesinopathy. Although some clinical manifestations overlap between CAID and other cohesinopathies, CAID syndrome is set apart in that it does not cause intellectual and growth retardation. In addition, there are no clinical phenotypes directly associated with the canonical role of SGO1 in centromeric cohesion and sister chromatids segregation, such as premature aging or cancer. Interestingly, fibroblasts from CAID patients showed accelerated cell-cycle progression, a higher rate of senescence and enhanced activation of transforming growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling at late passage (3), the first clinical identification of crosstalk between the TGF- $\beta$  and cohesin cascades. Unfortunately, homozygous *Sgo1* knockout mice and homozygous K23E knock-in mice are embryonic lethal (data not shown), leaving only cell-based models for the study of this condition (9).

The clinical observations raise essential pathophysiological questions about the role of SGO1 and have prompted us to perform unbiased screens to identify the molecular signature of CAID syndrome in vivo along all steps of the central dogma. Here, we investigated how the *SGO1* mutation affects regulation on epigenetic, RNA expression, and proteomic levels using reduced representative bisulfite sequencing (RRBS), assay for transposase-accessible chromatin with high throughput (ATAC) sequencing, RNA sequencing, and stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) on CAID patient fibroblasts. Because the first symptoms of CAID pathology are not present at birth and appear from 5 years of age onward, the phenotypic manifestations seem to be associated with aging. Thus, the screens were carried out on early (p8) and late (p14) passages. We report differential expression of several genes involved in the cohesin complex and cell-cycle regulation, cardiac conduction and smooth muscle identity and contraction as well as perturbation of potassium currents in CAID syndrome, canonical TGF- $\beta$  signaling, DNA methylation and chromatin compaction. These results expose unanticipated non-canonical roles for SGO1 in CAID pathogenesis and raise important questions for other disorders of gastrointestinal motility.

## Results

### Transcriptome profiling of CAID syndrome

To characterize the transcriptomic profile of CAID patients homozygous for the *SGO1* K23E mutation (MUT/MUT) vs wild-type *SGO1* controls (WT/WT), we performed paired-end RNA sequencing on human dermal fibroblasts from 3 cases and 3 controls at early (p8) and late passages (p14). Consistent with the more pronounced phenotype with aging, we identified 173 down-regulated and 188 upregulated genes at p8 while at p14, we identified 346 downregulated and 531 up-regulated genes (Figure 1A, Supplementary Table S1). Volcano plots of differentially expressed genes at p8 and p14 showed that the vast majority of messenger RNA (mRNA) expression changes observed between CAID patients and controls are less than 4-fold (Figure 1B). Biological functions associated with differentially expressed genes at p8 also were associated with gene expression differences at p14. However, additional biological functions including heart development and contraction, muscle contraction, chromatin compaction, behavior and potassium channels also were identified at p14 (Tables 1 and 2, Supplementary Table S2). At p8, we identified a specific cluster of upregulated genes (35 genes) associated with the cell cycle, and this cluster is considerably larger at p14 (109 genes). Of note, we detected up-regulation of the following genes at different levels of significance: *SGO1* itself; *SGO2*, the second member of the shugoshin family involved mainly in meiosis; Budding Yeast By Benzimidazoles 1 (*BUB1*) and *PLK1*, required for SGO1 localisation at the centromere (Figures 1D and 2A). At early passage (p8), SGO1, SGO2, BUB1 and PLK1 mRNA levels are higher in CAID patients compared to controls and at late passage (p14), their levels are maintained or up-regulated in CAID patients and decreased in controls. This correlates with overexpression of BUB1 in CAID patients at protein level (Figure 3C and D). Thus, the *SGO1* K23E mutation does not abolish normal SGO1 function in mitosis<sup>3</sup> but may be associated with causal or compensatory overexpression of SGO1, SGO2, BUB1 and PLK1. Interestingly, we also noticed a significant upregulation of *ESCO2*, a gene involved in Roberts syndrome, another cohesinopathy (Figure 1D). This led us to investigate whether other cohesin components are dysregulated as well, and we found a trend towards up-regulation for *AFF4*, *DDX11*, *NIPBL*, *RAD21* and *SMC3* in CAID patients, although the log<sub>2</sub> fold changes and/or q values of the

mRNA expression levels were below the threshold (Figure 2B). Interestingly, we also found a significant up-regulation of *BIRC5*, an anti-apoptotic gene that binds an amino-terminal motif of SGO1 (Figure 1D) (10). *BIRC5* contributes to the control of the total cardiomyocyte number and its cardiac-specific knock-out leads to conduction defects and sino-atrial node dysfunction (11, 12). We also identified down-regulation of potassium voltage-gated channels *KCNJ2* (Kir2.1), *KCNJ8* (Kir6.1) and *KCND2* (Kv.4.2), suggesting altered potassium channel currents in CAID syndrome (Figure 1D). Taken together, these data suggest that cell-cycle regulation, cardiac conduction, chromatin compaction and potassium channels are key pathways involved in CAID syndrome.

### **Proteome profiling of CAID syndrome**

To investigate the effect of the *SGOI* K23E mutation on protein expression, we performed SILAC on human dermal fibroblasts from 3 CAID patients and 3 controls. Cells were mixed together in a 1:1 ratio to form 3 duos composed of a wild-type control and a CAID patient. Since the global protein expression between duos was highly variable, we decided to look specifically at proteins differentially expressed in more than 1 duo (Figure 3A, Supplementary Table S3). At the earliest passage accessible by SILAC (p10), we detected 458 proteins, while at late passage (p14), 551 proteins were detected. At early passage (p10), 22 proteins were differentially expressed ( $q\text{-value} \leq 0.01$ ) between duos while at late passage (p14), we identified 20 proteins (Figure 3B). Gene ontology (GO) analysis revealed that most of them are involved in extracellular matrix organization, regulation of actin cytoskeleton and cardiac and smooth muscle contraction (Tables 3 and 4, Supplementary Table S4). We identified tropomyosin (TPM) 1, TPM2 and TPM4 and Transgelin (TAGLN) as interesting biological candidates. TPMs codes for tropomyosin family members which play a major role in cardiac and smooth muscle contraction through CALD1 binding and subsequent actin cytoskeleton stabilisation (13). TAGLN, also known as SM22 $\alpha$ , is an actin-binding protein from the calponin family has been suggested to regulate smooth muscle contractility through regulation of Ca<sup>2+</sup>-independent contractions (14). Overexpression of TPM1 and TAGLN in CAID patients has also been confirmed at the protein level using Western blotting (Figure 3C and D). These results designate smooth muscle contraction through TPMs and TAGLN as a plausible pathway involved in CAID gastrointestinal phenotype.



## **Gastrointestinal histology of CAID syndrome**

To confirm the results of unbiased screens of the CAID proteome and transcriptome, we performed immunohistochemistry by 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) and fluorescence staining on gut biopsy specimens. We performed staining in absence of primary antibody (negative control) to make sure that the signal was not caused by nonspecific tissue reactivity (Figure 4A and 5B). We further confirmed our results through immunizing peptide blocking experiment to ensure the specificity of the antibodies used (Figures 5A). These experiments reveal BUB1 overexpression in the gut of CAID patients (Figure 4C), which is most striking in the muscularis externa and intestinal villi (Figure 5C). Similarly, SGO1 expression is higher in CAID patients compared to controls and this differential expression is enhanced in the muscularis externa and the villi (Figures 4B and 5C). Finally, we found TAGLN to be overexpressed specifically in muscularis mucosa and muscularis externa of CAID patients (Figures 4D and 5D). We previously reported thinning of smooth muscle layers, disruption of fiber architecture of smooth muscles and extensive fibrosis, a hallmark of chronic TGF- $\beta$  activation, in CAID patient guts (3). Taking this into consideration, overexpression of TAGLN in muscular layers might be indicative of reparative changes. Such changes could indicate either a causal pathomechanism or compensatory processes in damaged tissues. In summary, these results suggest a possible role of SGO1 and BUB1 in CAID gastrointestinal phenotype.

## **Electrophysiology of potassium channels in CAID fibroblasts**

Since we noticed a decrease of KCNJ2, KCNJ8 and KCND2 mRNA levels, we explored potential contributions of different potassium currents to the pathogenesis of CAID syndrome by performing electrophysiology on CAID patient dermal fibroblast cell lines. We identified the inward rectifying potassium current (IK<sub>1</sub>) to be significantly reduced in CAID patient cell lines vs controls (Figure 6A and B). The resting membrane potential (RMP), controlled by IK<sub>1</sub>, was decreased accordingly (Figure 6C). However, no difference was detected in the outward potassium current (including the Transient outward potassium current (I<sub>to</sub>)) (Figure 6D and E). These findings suggest that IK<sub>1</sub> is impaired in CAID syndrome and could lead to imbalance in cell excitability.

## Characterization of TGF- $\beta$ signaling in CAID patient fibroblasts

Since TGF- $\beta$  signaling is clinically relevant in arrhythmias and plays a role in CAID syndrome (3, 15), we quantified response to ligand stimulation of canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling pathways in CAID patients to further investigate the impact of the *SGO1* K23E mutation. First, we confirmed the known activating effect of the *SGO1* K23E mutation on the canonical pathway by measuring SMAD3 phosphorylation (Figure 6F). Independent of genotype, there was a significant increase of SMAD3 phosphorylation between early (p8) and late (p14) passage. At early passages (p8), there was no biologically meaningful difference in SMAD3 phosphorylation. At late passage (p14), SMAD3 phosphorylation was significantly higher in CAID patients, regardless of the TGF- $\beta$ 1 concentration used, even without stimulation. These results confirmed that *SGO1* K23E increases Phospho-SMAD3 (pSMAD3) with and without stimulation and that this effect is enhanced with cell aging. At early passage (p8), the half-maximal effect (median effective concentration) is reached earlier in patients vs controls (0.0120 ng/ml vs 0.0014 ng/ml), an effect which is lost at p14 (median effective concentration, 0.007 ng/ml vs, 0.010 ng/ml) (Figure 6G). This suggests that while pSMAD3 increases, sensitivity to TGF- $\beta$ 1 ligand is higher only at early passages. We analyzed the response of the noncanonical TGF- $\beta$  pathway by means of Phosphop38 mitogen-activated protein kinase (pp38 MAPK), Phospho-extracellular signal-regulated kinase (pERK1/2), and p-c-jun-N-terminal kinase (pJNK1/2/3) measurements. This analysis revealed that only wildtype fibroblasts, but not CAID cell lines acquired a sensitivity to ligand stimulation at passage 14, but not at early passages for pp38 MAPK and pERK1/2 (Figure 6F and G). Interestingly, stimulation with TGF- $\beta$ 1 has no effect on the phosphorylation of JNK1/2/3 for both genotypes (Figure 6F). These results show a surprising uncoupling of the two pathways, potentially through a specific interaction with BUB1. In addition, at passage 14, we identified upregulation of DUSP2, a dual-specificity phosphatase known to dephosphorylate ERK1/2, p38 and JNK (Figure 1D) (16). Cumulatively, these analyses point to an up-regulation of canonical TGF- $\beta$  signaling and uncoupling of canonical from noncanonical signaling in CAID pathology.

## Epigenomics of CAID syndrome

RNA sequencing analysis identified several differentially expressed genes as well as chromatin-related pathways in CAID patients, prompting us to study a potential role of SGO1 in epigenetic regulation through DNA methylation and chromatin compaction. To survey the methylation profile of CAID patients vs controls genome-wide at early (p8) and late (p14) passage, we used RRBS. A total of 375,002 tiles and 497,974 tiles respectively were interrogated at early (p8) and late passage (p14), where tile refers to a 100-bp region containing a minimum of 2 CpG islands. A total of 4702 (4498 hypermethylated, 204 hypomethylated) and 2746 (2568 hypermethylated, 178 hypomethylated) differentially methylated tiles ( $\geq 30\%$  methylation difference) were respectively detected at early (p8) and late passage (p14) (Figure 7A, B and C, Supplementary Table S5). Surprisingly, we found that CAID patients have significantly higher global methylation than controls for both passages. A total of 95.7% and 93.5% of the altered regions are hypermethylated in CAID patients at early (p8) and late passage (p14) respectively, pointing to global DNA hypermethylation as a possible pathomechanism in CAID syndrome. Differentially methylated tiles in genic regions (introns, exons, promoter-transcription starting site, termination-transcription termination site, 3' untranslated regions and 5' untranslated region), were associated with several biological pathways including heart and smooth muscle contraction, cellular potassium ion transport as well as neuronal system process and behavior, features that are commonly found in other cohesinopathies (Tables 5 and 6, Supplementary Table S6). Of note, we identified regions associated with cellular potassium ion transport genes, supporting the hypothesis of a deregulation of potassium channels in CAID. However, no hypermethylation was observed in *KCND2*, *KCNJ2* and *KCNJ8* genic regions. The global hypermethylation pattern was also confirmed by pyrosequencing of two CpG sites in Long interspersed nuclear element (*LINE-1*) retrotransposons, which cover approximately 17% of the genome (17). We observed significantly higher *LINE-1* methylation genome-wide in CAID patients for both passages studied (Figure 7D). At early passage (p8), we observed an increase in methylation percentage around 15% and 5% for the CpG1 and the CpG2 sites, respectively. Similar results were obtained at late passage (p14), where an increase in methylation percentage around 10% and 5% was observed for the CpG1 and the CpG2 sites, respectively.

The striking global methylation signature of CAID prompted us to perform ATAC sequencing on 3 controls and 3 CAID patient cell lines at early (p8) and late passage (p14) to assess the chromatin accessibility profile (Transposase peaks). In parallel with these findings, we observed a mild chromatin closing signature at early (p8) passage which is enhanced at late (p14) passage, suggesting that at late passage (p14) the effect of the mutation is stronger (Figure 5E, F and G, Supplementary Table S7). Transposase peaks near gene transcription starting site (TSS) were mainly associated within the same pathways identified by RNAseq and RRBS analysis (Tables 7 and 8, Supplementary Table S8). In aggregate, these data suggest that epigenetic modifications at methylation and chromatin configuration level participate in CAID pathogenesis.

## Discussion

CAID syndrome is a part of the cohesinopathy family, alongside Cornelia de Lange syndrome (CdLS) (*NIPBL*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3* and *HDAC8*), Robert syndrome (*ESCO2*), Warsaw breakage syndrome (*DDX11*) and others that result from mutations in cohesin complex components. Although there is some phenotypic overlap between CAID and other cohesinopathies (valve defects and gastro-intestinal defects), CAID patients do not show intellectual and growth retardation. In addition, the clinical manifestations observed in CAID syndrome are difficult to reconcile with perturbation of canonical roles of SGO1 in cell cycling, suggesting that novel noncanonical roles of SGO1 are involved in CAID pathology. It has been demonstrated over the recent years that components of the cohesin complex play important roles in long-range transcriptional regulation (18, 19). Indeed, *RAD21*, *SMC1A* and other interaction partners of SGO1 are involved in regulation of transcription (20, 21). Thus, a noncanonical role of SGO1, possibly through 11-Zinc Finger Protein (CTCF) loading, chromatin remodelling and epigenetic marks in maintaining transcriptional modules during cardiac and intestinal development is therefore likely (21, 22). The early embryonic lethality of most cohesin component knockouts makes it impossible to precisely replicate cohesinopathies in mice without use of more sophisticated models. Homozygous *Sgo1* knockout mice and homozygous K23E knock-in mice are embryonic lethal, leaving dermal fibroblasts and intestinal biopsies from CAID patients as the only proxy available for characterisation and understanding of the mechanisms involved in CAID syndrome (<sup>9</sup> and data not shown).

In this study, we therefore follow all steps of the transcriptional cascade from epigenetics to proteomics in order to define a molecular signature of CAID syndrome. Although we did not identify a single driver pathway in CAID pathogenesis, multiple cumulative hits within related cascades seem to converge on a transcriptional dysregulation influenced by epigenetic and TGF- $\beta$  related events. At mRNA level, especially at late passage (p14), the most striking finding is up-regulation of *SGO1* and *SGO2*, along with many other genes involved in cell cycling or the cohesin complex, including direct interactors such as *BUB1*, *PLK1* and *BIRC5*. Given that CAID fibroblasts exhibit centromeric cohesion defects with only mild acceleration of cell cycling and without any impact on fidelity of mitosis or integrity of the genome (3), the observed effects of the *SGO1* K23E mutation may be mainly compensatory. In fact, it is conceivable that overexpression of SGO1, SGO2, BUB1 and PLK1 can attenuate direct effects of *SGO1* K23E. Future studies should be directed at dissecting whether this overexpression is compensatory or causal.

In addition, recent publications describe noncanonical postmitotic cohesin functions. The serine/threonine kinase BUB1, previously recognized to play an important role in establishing the mitotic spindle checkpoint, has now been found to be required for canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling through type I Transforming Growth factor Beta Receptor 1 (TGFBR1) recruitment (23). This raises the possibility that enhanced TGF- $\beta$  signaling in CAID patient cell lines is due to overexpression of BUB1. Furthermore, we show here that *SGO1* K23E uncouples canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling: while canonical TGF- $\beta$  signaling is enhanced in CAID patient fibroblasts at early passage and increases further with late passage, a concomitant increase of noncanonical signaling occurs only in wildtype fibroblasts, but not CAID cell lines. This surprising uncoupling of the two TGF- $\beta$  signaling pathways suggests that the *SGO1* K23E mutation favours the canonical pathway through an unknown mechanism, possibly through a specific interaction with BUB1. This hypothesis is strengthened by the overexpression and the similar localisation pattern of SGO1 and BUB1 in the villi and the muscularis externa from CAID patient intestines. On the other hand, the up-regulation of *DUSP2* correlates with the inhibition of the noncanonical ERK1/2 MAPK, p38 and JNK signaling in CAID. All these results point to canonical TGF- $\beta$  signaling as a key cascade involved in the intestinal manifestations of CAID syndrome and is a clinical identification of crosstalk between the TGF- $\beta$  and cohesin cascades.

Interestingly, we also identified a trend towards upregulation for genes involved in other cohesinopathies, with the most drastic changes for *ESCO2*, *RAD21* and *SMC3*. Autosomal-dominant mutations in *RAD21* and *SMC3* have been associated with Cornelia de Lange syndrome while recessive mutation in *RAD21* has been found in CIPO. Analysis of *RAD21* mutations and depletion in zebrafish models showed impaired cellular DNA damage response, disrupted transcription and disruption of intestinal transit and development of enteric neurons, similar to patients with CIPO, suggesting that these manifestations result from a loss-of-function of *RAD21* while in our case, we found an up-regulation of *RAD21*, potentially representing a causal or compensatory mechanism (8, 24). In most cases, *SMC3* and *ESCO2* mutations do not cause gastrointestinal defects.

Even with recent advances in proteomic field, characterization of CAID patient proteome was challenging. Since the dynamic range of SILAC for protein identification and quantification in humans can vary between 1,000 and 5,000, the whole proteome is not covered (25). The workflow of SILAC does a single comparison between a control and a CAID patient without cross-link between the different samples, giving rise to a lot of variations between duos. Furthermore, SILAC cannot detect proteins expressed at low level, as was the case of several candidate genes identified by RNA sequencing. However, investigation of the proteome in CAID syndrome revealed valuable insight into CAID pathomechanisms. We identified TPM1 and TAGLN as important genes overexpressed in CAID syndrome. Since TPM1 and CALD1 regulate smooth muscle contractions through  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent actin stabilization, it is conceivable that overexpression of TPM1 perturbs smooth muscle contraction, either through contraction stalling or insufficient compensation (myogenic CIPO) (13). TGF- $\beta$  signaling positively regulates both TPM1 and TPM2, increases smooth muscle contractile force and tissue remodelling (26). TAGLN is a canonical TGF- $\beta$  inducible gene acting as an actin-crosslinking/gelling protein of the calponin family, which can regulate actin contractile function through  $\text{Ca}^{2+}$ -independent contraction (14). Studies on TAGLN deficient mice showed that TAGLN knock-out significantly inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -independent but not  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent vascular contractility (27). Thus, overexpression of TAGLN might be a causal or compensatory process, either to balance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and -independent smooth muscle contractions or to bypass the perturbation of contraction secondary to the disruption and fibrosis of smooth muscle observed in CAID patients.

We found that  $IK_1$  was reduced significantly in CAID patient cell lines vs controls. This observation directly correlates with the downregulation of *KCNJ2*, the ion-channel subunit that carries  $IK_1$ . The RMP was decreased accordingly.  $IK_1$  is critically important to establish the resting membrane potential and thereby control excitability of a wide range of cells (28). The large changes in  $IK_1$  that we observed in CAID patient cells are strong candidates to underlie abnormalities in fibroblast, cardiomyocyte and colonic function (29-31). Further work is needed to relate this ion-channel dysfunction to specific components of CAID pathophysiology.

The results of this study also support the idea that CAID syndrome is a transcriptional dysregulation disorder. In addition to the unique differentially expressed genes network identified by RNA sequencing, the global methylation pattern observed in patients as well as the chromatin compaction signature suggest that epigenetic regulation has pathogenetic significance in CAID syndrome. This assertion is further strengthened by the significantly higher methylation of *LINE-1* retrotransposons in CAID patients. Indeed, pyrosequencing of *LINE-1* retrotransposons, representing around 17% of the human genome, is a well-established technique to survey global DNA methylation (17). While DNA methylation is commonly associated with gene silencing, such a correlation was not found in our study. This is in line with recent studies showing that methylation can maintain gene expression through promoter blocking, and that gene down-regulation results from DNA methylation-independent mechanisms (32, 33). As an example, increase DNA methylation in gene body can result in increased gene expression (34, 35). Although RRBS provides a large (~1.5 million CpG), but partial view of the 30 million CpG present in the genome, only a portion of indicative regions regulating gene expression (i.e., promoters and enhancers) were evaluated. Nevertheless, RNA sequencing, RRBS and ATAC sequencing analysis converged on common pathways in CAID and underscore a noncanonical role of SGO1 in transcriptional regulation through chromatin remodelling and epigenetic marks.

In conclusion, intestinal manifestations of CAID syndrome most likely result from several changes with a cumulative effect, and not a single dysregulated gene. We point out the dysregulation of canonical TGF- $\beta$  signaling, DNA hypermethylation, chromatin compaction and decrease of  $IK_1$  as a vicious cycle producing the striking intestinal manifestations of CAID syndrome. Dysregulation of druggable pathways such as the TGF- $\beta$  cascade and methylation may provide targets towards the identification of medical therapies for CAID syndrome, but

also for study in other gastrointestinal conditions such as CIPO and irritable bowel syndrome that affect patients worldwide.

**Received May 23 2018, Accepted October 17, 2018.**

### **Correspondence**

Address correspondence to: Gregor Andelfinger, MD, FRCPC, Service of Cardiology, Department of Pediatrics, Cardiovascular Genetics Research Laboratory, Centre Hospitalier Sainte Justine Research Center, Université de Montréal 3175, Chemin Côte Sainte Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada. E-mail: gregor.andelfinger@recherche-ste-justine.qc.ca, fax: (514) 345-4896.

### **Acknowledgements**

The authors are profoundly thankful to all participating families and patients. The authors thank E. Bonneil and the Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) proteomic platform for expert assistance.

### **Members of the CoHeart Consortium**

Gregor Andelfinger, Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine Research Center, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Jeroen Bakkers, Hubrecht Institute-KNAW and University Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands.

Bart Loeys, Cardiogenetics, Center for Medical Genetics, University of Antwerp/Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium.

Michel Pucéat, Université Aix-Marseille, INSERM UMR-1251, Marseille, France, and Laboratoire International Associé INSERM, Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine Research Center, Montréal, Québec, Canada.



## Material and Methods

All authors had access to the study data and had reviewed and approved the final manuscript.

### Skin biopsies and cell lines

Human tissue acquisition from CAID patients was approved by the ethical committees at all participating institutions. Primary human dermal fibroblasts were derived from skin biopsies from 3 wild-type controls and 3 CAID patients. The study was conducted after patient's informed consent. All assays were performed at early (p8-p10) and a late (p14) passages. Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult (HDFa) (ATCC PCS-201-01, lot 61447289 and 61683453) and BJ(HDFn) (ATCC CRL-2522) have been used as control cell lines for SILAC experiment. All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma infection.

### Transcriptomic studies

*RNA extraction, libraries preparation and RNAsequencing.* RNA extraction from human dermal fibroblasts (3 controls and 3 CAID patients) at p8 and p14 was performed using miRNAeasy mini kit (217004; Qiagen, Hilden, Germany) on automated QIAcube (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA libraries were generated on 500 ng of RNA with RNA integrity number (RIN) >9 using the Illumina TruSeq Stranded Total RNA Sample preparation kit (20020596; Illumina, San Diego, CA). Libraries were sequenced over multiple flow cells on the Illumina HiSeq4000, paired-end, 100-bp.

*RNA sequencing data processing and analysis.* Trimmomatic (v.0.32; Usadel lab, Jülich and Aachen, Germany) was used to remove Illumina adapters from the raw reads (36). Reads with a quality score <30 and smaller than 32 bp were eliminated. The remaining reads were mapped to the hg19 human reference using Bowtie2 (v.2.1.0; Johns Hopkins University, Baltimore, MD) and TopHat (v.2.1.0; Johns Hopkins University) (37, 38). FeatureCounts (v.1.4.4; Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australia) was used to count mapped reads (39). TMM algorithm (i.e. weighted trimmed mean of M-values) in the edgeR package (Bioconductor; Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Buffalo, NY) was used to normalize gene expression levels across samples (40). The data were log-transformed,

and we applied voom function in the limma package (Bioconductor) to get precision-weights data (41). Limma was also used to perform a weighted fit on the weighted data obtained from voom using lmFit function. To investigate genotype effects on gene expression in dermal fibroblasts at passage 8 and passage 14, we used a nested linear model with the following design: Gene expression ~ Sex + Biopsy\_Age + Genotype:Passage. Nominal p-values provided by lmFit were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. Sex chromosomal or low-count genes with have an average read count lower than 10 across all samples were excluded, resulting in 13,920 genes in total. Genes with a log2 fold change >1 and <-1 were considered as up-regulated and down-regulated respectively. FDR-adjusted P value (q value) <0.1 was considered as significant. The complete list of differentially expressed genes can be found in Supplementary Table S1. Gene ontology analysis (GO) was performed using Metascape [<http://metascape.org>] (42). The complete GO analysis results can be found in Supplementary Table S2.

*Real time PCR validations.* RNA was reverse-transcribed into cDNA using SuperScript IV Reverse Transcriptase (18090050; Invitrogen, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed with FastStart Universal SYBR Green Master (11340500; Roche, Bâle, Suisse) using a LightCycler 96 Real-Time PCR system (Roche). Transcripts were normalized to GAPDH.

## **Proteomic studies**

*Cell culture and Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture (SILAC).* SILAC DMEM medium without L-arginine and L-lysine (88364; Thermo Scientific, Waltham, MA) was supplemented with <sup>13</sup>C6, <sup>15</sup>N4 L-arginine (20104102; Silantes, München, Germany) and <sup>13</sup>C6, <sup>15</sup>N2 L-lysine (2111604102; Silantes) or unlabeled <sup>12</sup>C6<sup>14</sup>N4 L-arginine (A5006; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and <sup>12</sup>C6L-lysine (L5501; Sigma Aldrich) to produce "heavy" and "light" SILAC media respectively. L-proline (P5607; Sigma Aldrich) was also added to a final concentration of 100 µg/mL to prevent amino acids conversion. 500,000 fibroblasts from 3 controls and 3 CAID patients were seeded and grown in "heavy" and "light" medium respectively for at least 7 doubling times to ensure complete amino acid incorporation.

*SILAC Cells lysis and digestion.* The "heavy" and the "light" labeled cells were mixed together in a 1:1 ratio to form 3 duos composed of a wild-type control and a CAID patient. The mixed cells were centrifuged at 14,000 rpm at 4 ° C for 15 minutes. The cell pellets were

resuspended in cold lysis buffer (1% sodium deoxycholate (SDC) in 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) and sonicated with the Fisher Sonic Dismembrator Model 100 to lyse the cells. The samples were then immediately transferred to an Eppendorf Thermomixer R (Eppendorf, Hamburg, Germany) and incubated at 99°C for 5 minutes with shaking at 1400 rpm. The samples were then centrifuged at 40,000g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was harvested, DTT was added to obtain a final concentration of 5mM and the samples were shaken at 800 rpm for 30 minutes at 56°C. After being returned to room temperature, the iodoacetamide was added to a final concentration of 15 mM and the samples were incubated for 30 minutes in the dark. Trypsin was finally added at a final concentration of 5-10 ng /  $\mu\text{L}$  with a protein: trypsin ~ 50: 1 - 200: 1 ratio and the samples were incubated at 37°C overnight. The enzymatic digestion was stopped by adding 30% TFA to obtain a final pH ~ 2 and centrifuged at 13,000 g for 5 minutes. Peptide digestion (supernatant) was transferred to a new tube and the pellet was washed with 0.1% TFA and then centrifuged again. The supernatant was added to the peptide digestion (43).

*SILAC Desalting, concentration and mass spectrometry data acquisition.* Samples were loaded on a homemade C18 precolumn directly connected to the switching valve of a homemade reversed-phase column with a gradient from 10–60% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on a NanoLC-2D system (Eksigent, Dublin, CA) connected to an Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 70,000 resolution was followed by 12 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing.

*SILAC data processing and analysis.* Data processing was performed using Maxquant (v1.5.0.25; Max Planck Institute of Biochemistry, Planegg, Germany) (44). Tolerances on precursors and fragments were 15 ppm and 0.01 Da, respectively. Variable selected post-translational modifications were carbamidomethyl (C), oxidation (M), deamidation (NQ). SILAC labels selected were R10 (13C6, 15N4) + K8 (13C6, 15N2) for the heavy label. Genes with a fold change >1.5 and <0.66 were considered as overexpressed and underexpressed respectively. FDR-adjusted p-value (q-value)  $\leq 0.01$  was considered as significant. The complete list of differentially expressed proteins can be found in Supplementary Table S3. Gene ontology analysis (GO) was performed using Metascape [<http://metascape.org>] (42). P-values were calculated based on accumulative hypergeometric distribution and corrected for multiple testing

using the Benjamini-Hochberg procedure. The complete GO analysis results can be found in Supplementary Table S4.

*Western blot validations.* Protein lysates were extracted from fibroblasts. 25 µg of proteins were loaded on 12% SDS-PAGE gel (4561034; Biorad, Hercules, CA) and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were probed against SGO1 (mouse monoclonal, ab58023; Abcam, Cambridge, UK), BUB1 (mouse monoclonal, sc-365685; Santa Cruz, Dallas, TX), SM22 $\alpha$  (rabbit polyclonal; sc-50446, Santa Cruz) and TPM1 (rabbit polyclonal; sc-28543, Santa Cruz) primary antibodies diluted 1:200 followed by HRP-conjugated secondary antibodies. The blots were developed using SuperSignal (34580; Thermo Scientific). Signal intensity was quantified using ImageJ (v.1.48; National Institutes of Health, Bethesda, MD) (45).

## **Tissue Studies**

*Immunohistology on intestine.* Paraffin embedded sections (5 µm thick) were immunostained using Ultravision LP Detection system HRP polymer & DAB Plus Chromogen kit (TL-015-HD; Thermo Scientific) for DAB staining. The slides were rehydrated by successive baths (Xylène, EtOH 100%, EtOH 90%, EtOH 70%, EtOH 50%, dH<sub>2</sub>O). Antigen retrieval was done by heating at 68°C for 20 min in 1mM Citrate (pH 6.0) and cool down to RT. Slides were then incubated in 0.3% Triton for 30 min and blocked in PBS + 10% Serum (Goat serum for DAB staining and Donkey Serum for fluorescent staining). For immunostaining SGO1 (anti-mouse, ab58023; Abcam), BUB1 (mouse monoclonal, sc-365685; Santa Cruz and rabbit polyclonal, Ab70372; Abcam) and TAGLN (rabbit polyclonal, sc-50446; Santa Cruz) were diluted 1:500 for DAB and 1:200 for fluorescence staining. The primary antibodies were targeted with IgG secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for DAB staining and donkey anti-mouse and anti-rabbit Alexa 555 and 647 for fluorescent staining (1:500 dilution, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA). DAB immunostainings were counterstained using methyl green and mounted with Permount medium. Fluorescent immunostainings were mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole incorporated anti-fade medium (P36962; Thermo Fisher Scientific). Immunohistochemistry control experiments were done by excluding the primary antibody. Immunizing peptide blocking was also performed

following the protocol describe above. 5 times excess of BUB1 (H00000699-Q01; Novus Biologicals, Littleton, CO) and TAGLN (NBP1-45267; Novus Biologicals) human recombinant peptides was added to the primary antibody by weight. Pixel intensity was corrected for noise by subtraction of the immunofluorescence background in negative controls. Imaging of DAB stained tissues was done using a Zeiss AxioScan Z1 slide scanner and analyzed with Zen software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Fluorescent-stained tissues were imaged using a Leica DMi8 inverted fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with a 40X objective. Images processing was done with Leica LAS X software.

### **Cell culture assays**

*Patch clamp: ionic current an RMP recording.* Ionic Current and RMP Recording. All in vitro recordings were obtained at 37°C. The whole-cell perforated-patch technique was used to record RMP in current-clamp mode, and tight-seal patch clamp was used to record IK1 in voltage clamp mode. Borosilicate glass electrodes filled with pipette solution were connected to a patch-clamp amplifier (Axopatch 200A; Axon Union City, California, USA). Electrodes had tip resistances of 6 to 8 MΩ. Nystatin-free intracellular solution was placed in the tip of the pipette by capillary action (≈30 s), and then pipettes were backfilled with nystatin-containing (600 μg/mL) pipette solution. IK1 was recorded as the 300-μmol/L Ba<sup>2+</sup>-sensitive current. Tyrode solution contained (mmol/L) NaCl 136, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, dextrose 10, and HEPES 5, titrated to pH 7.3 with NaOH. The pipette solution for RMP, outward potassium current and IK1 recording contained (mmol/L) GTP 0.1, potassium aspartate 110, KCl 20, MgCl<sub>2</sub> 1, MgATP 5, HEPES 10, sodium phosphocreatine 5, and EGTA 0.005 (pH 7.4, KOH). A total of 10 mM tetraethylammonium (TEA) was used to block outward potassium current. Junction potentials between bath and pipette solutions averaged 10.5 mV and were corrected for RMP measurements only. Currents are expressed as densities (pA/pF) to control for differences in cell size/capacitance.

*Alpha screen TGF-β signaling assays.* The phosphorylation state of SMAD3, p38, ERK1/2 and JNK1/2/3 was quantified using Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assays (ALPHA) (Perkin Elmer Waltham, Massachusetts, USA). 12,000-15,000 cells/well were seeded in a 24-well plate. 48h after plating, the cells were starved overnight in total absence of FBS. They were then stimulated with different concentrations of TGF-β1 (0-100 ng/ml) for

1 hour, washed with PBS and lysed for 20 minutes at room temperature using 200 µl/well of AlphaScreen SureFire Ultra lysis buffer supplemented with proteases inhibitors. The quantifications were performed in 384-well plates (Proxiplate, Perkin Elmer), according to protocol guidelines and measured with the EnVision 2104 plate reader. Six independent measurements were performed for each cell line and experiments were repeated four times.

## **Epigenetic studies**

*Library preparation and Reduced Representative Bisulfite Sequencing (RRBS).* DNA extraction from human dermal fibroblasts (3 controls and 3 CAID patients) at p8 and p14 was done using QIAamp DNA Mini Kit (51304; Qiagen). 500 ng of genomic DNA were digested with MspI overnight at 37°C in an Eppendorf Thermocycler. Without deactivating MspI and cleaning-up the digestion reactions, DNA end repair and A-tailing was conducted by adding Klenow fragment (3'→5' exo-) (M0212M; New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) and dNTP mixture (10 mM deoxyadenosine triphosphate (dATP), 1 mM deoxycytidine triphosphate (dCTP) and 1 mM deoxyguanosine triphosphate (dGTP)) directly into each sample in the strip tube. The reaction was incubated at 30°C for 20 minutes and then at 37°C for 20 minutes. Bead cleanup was conducted using AMPure XP beads (B37419AB, Beckman Coulter, Brea, California, USA) to remove small fragments. Ligation of NEB methylated adaptors (E7535, New England Biolabs) to DNA samples was done using T4 DNA ligase enzyme (M0202S, New England Biolabs) at 20°C for 20 minutes. USER enzyme (M5505S; New England Biolabs) was added, and the reaction has been incubated for at 37°C for 15 minutes. The reaction has been cleaned up using AMPure XP beads (B37419AB; Beckman Coulter). Bisulfite conversion and clean up was then performed on purified DNA using the EpiTect Fast bisulfite conversion kit (59824; Qiagen). Libraries of the bisulfite-converted DNA were generated by PCR reaction using the PfuTurbo Cx Hotstart DNA Polymerase (600410; Agilent, Santa Clara, California, USA), deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) (10mM), NEB indexing primers and NEB universal primers (E7535L; New England Biolabs) coupled with SYBR Green (S7563; Thermo Fisher Scientific). The libraries were cleaned using AMPure XP beads (B37419AB; Beckman Coulter). Paired end sequencing of the libraries has been performed on Illumina HiSeq 2500, paired-end 125 pb.

*RRBS data processing and analysis.* Bsmapp (v.2.6; Dan L Duncan Cancer Center, Houston, Texas, USA) was used for initial data processing, methylation calls and reads alignment (46). Analysis and statistics of differentially methylated regions was performed using MethylKit (v.0.5.3; Bioconductor), a software based on Benjamini–Hochberg FDR procedure (P value threshold of  $q = 0.01$ ) (47). Specific parameters were chosen including 100-bp step-wise tiling windows, 2 CpG minimum per tile and a minimum 30× CpG coverage of each tile per sample. The methylation level of a 100-bp tile was the average of all single CpGs within the tile, and the methylation level reported for a sample was the average methylation level across replicates. To identify differentially methylated (DM) CpG tiles in CAID patients vs controls at each passage, we used the R package DSS (Bioconductor) (48) with the following model: Methylation ~ Sex + Biopsy\_Age + Genotype:Passage. We defined DM tiles as those showing a significant difference of methylation at an FDR ( $q$  value)  $< 0.01$  and an absolute mean methylation difference above 30% (375,003 and 497,975 tiles in P8 and P14, respectively). HOMER (v.3.51; Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, USA) was used to annotate differentially methylated sequences (49) The complete list of differentially methylated regions can be found in Supplementary Table S5. Gene ontology analysis (GO) was performed using Metascape [<http://metascape.org>] (42). The complete GO analysis results can be found in Supplementary Table S6.

*LINE-1 pyrosequencing.* DNA extraction from human dermal fibroblasts (3 controls and 3 CAID patients) at p8 and p14 was done using QIAamp DNA Mini Kit (51304; Qiagen). Bisulfite conversion was done as previously described in the RRBS methods. Bisulfite converted DNA was amplified and enriched for *LINE-1* conservative sequences using specific primers (*LINE-1* forward and *LINE-1* biotinylated reverse primer) designed with PyroMark Assay Design (Qiagen). The primers were designed to allow the coverage of two CpG sites. Methylation percentage of *LINE-1* CpG sites was assessed using PyroMark Q24 (Qiagen) pyrosequencing technology.

*Library preparation and Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing (ATAC sequencing).* ATAC sequencing libraries were generated from 100,000 human skin fibroblasts from 3 controls and 3 CAID patients Cells were lysed with ice-cold hypotonic cell lysis buffer (0.1% w/v Sodium Citrate Tribasic Dihydrate and 0.1% v/v Triton X-100) for 30 min on ice followed by a second 30 min lysis step with ice-cold cell lysis

buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% v/v IGEPAL CA-630; Bishop, Burlington, Ontario, Canada). Transposition reaction was carried out in 25 µl reaction volume using 5 µl of tagmentation DNA enzyme in 2x TD buffer (FC-121-1030; Illumina). EDTA (25mM) was added to the reaction mix before DNA recovery with MiniElute PCR Purification columns (2800; Qiagen). Paired end sequencing of the libraries has been performed on Illumina HiSeq 2500, paired-end 125 pb.

*ATAC sequencing data processing and analysis.* ATAC sequencing reads were trimmed for adapter sequences and low-quality score bases (Phred score < 20) and were mapped to the human reference genome (GRCh37/hg19). Mapping was performed using BWA-MEM (Source Forge, New York, USA) in paired-end mode at default parameters (50). Only reads that were properly paired and had a unique alignment (mapping quality > 10) were retained. PCR duplicates were removed using Picard tools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Peaks were first called on ATAC sequencing using the MACS2 (Liu lab, Cambridge, MA) software suite with the added parameters “-g hs -q 0.05 --keep-dup all --broad --nomodel --extsize 200 --nolambda” (51). For comparison between samples, all peaks from each sample were merged to provide one set of combined peaks. For quantification of the combined peaks, we used FeatureCount (v1.4.4) to count the number of overlapping reads for each sample (39). For all downstream analyses, we excluded sex chromosomal or low-count peaks with have an average read count lower than 30 across all samples, resulting in 69,249 peaks in total. Chromatin accessibility levels across samples were normalized using the TMM algorithm (i.e. weighted trimmed mean of M-values), implemented in edgeR R package (40). Afterwards, we log-transformed the data and obtained precision-weights using the voom function in the limma package.<sup>41</sup> Finally, we performed a weighted fit, using lmFit, (also from limma) and the weights obtained from voom. In order to interrogate for genotype effects on chromatin accessibility in fibroblasts at passage 8 and passage 14, we used a nested linear model with the following design: Chromatin Accessibility ~ Sex + Biopsy\_Age + Genotype:Passage. Nominal p-values provided by lmFit were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. ATAC-seq mapping statistics and the complete list of differentially methylated regions can be found in Supplementary Table S7. Peaks with a log<sub>2</sub> fold change >1 and <-1 were considered as more open and less open respectively. FDR-adjusted P value (q value) <0.1 was considered as significant. Gene ontology analysis (GO) was performed using Metascape



[<http://metascape.org>] (42). The complete GO analysis results can be found in Supplementary Table S8.

### **Statistical Analyses**

P values from RNA sequencing, SILAC, RRBS and ATAC sequencing experiments were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method (q value). GO analysis P values were calculated based on accumulative hypergeometric distribution and corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure. RT qPCR, western blots and LINE-1 retrotransposons methylation quantification significance was calculated using one-way ANOVA with Bonferroni post-test. Multiple group statistical comparisons (electrophysiology and TGF- $\beta$  signaling response) were obtained by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test, and individual group mean differences (electrophysiology) were evaluated by Student's t-test with Bonferroni correction.

## References

1. Stanghellini V, Cogliandro RF, de Giorgio R, Barbara G, Salvioli B, Corinaldesi R. Chronic intestinal pseudo-obstruction: manifestations, natural history and management. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastro-intestinal Motility Society* 2007;19(6):440-52.
2. Stanghellini V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Barbara G, Morselli-Labate AM, Cogliandro L, Corinaldesi R. Natural history of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction in adults: a single center study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2005;3(5):449-58.
3. Chetaille P, Preuss C, Burkhard S, Cote JM, Houde C, Castilloux J, Piche J, Gosset N, Leclerc S, Wunnemann F, Thibeault M, Gagnon C, Galli A, Tuck E, Hickson GR, El Amine N, Boufaied I, Lemyre E, de Santa Barbara P, Faure S, Jonzon A, Cameron M, Dietz HC, Gallo-McFarlane E, Benson DW, Moreau C, Labuda D, Zhan SH, Shen Y, Jomphe M, Jones SJ, Bakkers J. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *2014;46(11):1245-9.*
4. Gargiulo A, Auricchio R, Barone MV, Cotugno G, Reardon W, Milla PJ, Ballabio A, Ciccodicola A, Auricchio A. Filamin A is mutated in X-linked chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction with central nervous system involvement. *American journal of human genetics* 2007;80(4):751-8.
5. Lehtonen HJ, Sipponen T, Tojkander S, Karikoski R, Jarvinen H, Laing NG, Lappalainen P, Aaltonen LA, Tuupanen S. Segregation of a missense variant in enteric smooth muscle actin gamma-2 with autosomal dominant familial visceral myopathy. *Gastroenterology* 2012;143(6):1482-91.e3.
6. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science (New York, NY)* 1999;283(5402):689-92.
7. Giordano C, Powell H, Leopizzi M, De Curtis M, Travaglini C, Sebastiani M, Gallo P, Taylor RW, d'Amati G. Fatal congenital myopathy and gastro-intestinal pseudo-obstruction due to POLG1 mutations. *Neurology* 2009;72(12):1103-5.
8. Bonora E, Bianco F, Cordeddu L, Bamshad M, Francescatto L, Dowless D, Stanghellini V, Cogliandro RF, Lindberg G, Mungan Z, Cefle K, Ozcelik T, Palanduz S, Ozturk S, Gedikbasi A, Gori A, Pippucci T, Graziano C, Volta U, Caio G, Barbara G, D'Amato M, Seri M, Katsanis N, Romeo G, De Giorgio R. Mutations in RAD21 disrupt regulation of APOB in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology* 2015;148(4):771-82.e11.
9. Yamada HY, Yao Y, Wang X, Zhang Y, Huang Y, Dai W, Rao CV. Haploinsufficiency of SGO1 results in deregulated centrosome dynamics, enhanced chromosomal instability and colon tumorigenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2012;11(3):479-88.
10. Jeyapragash AA, Basquin C, Jayachandran U, Conti E. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure (London, England : 1993)* 2011;19(11):1625-34.
11. Levkau B, Schafers M, Wohlschlaeger J, von Wnuck Lipinski K, Keul P, Hermann S, Kawaguchi N, Kirchhof P, Fabritz L, Stypmann J, Stegger L, Flogel U, Schrader J, Fischer JW, Hsieh P, Ou YL, Mehrhof F, Tiemann K, Ghanem A, Matus M, Neumann J, Heusch G, Schmid KW, Conway EM, Baba HA. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation* 2008;117(12):1583-93.

12. Schrickel JW, Lickfett L, Lewalter T, Tiemann K, Nickenig G, Baba H, Heusch G, Schulz R, Levkau B. Cardiomyocyte-specific deletion of survivin causes global cardiac conduction defects. *Basic research in cardiology* 2012;107(6):299.
13. Smith CW, Pritchard K, Marston SB. The mechanism of Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *The Journal of biological chemistry* 1987;262(1):116-22.
14. Elsafadi M, Manikandan M, Dawud RA, Alajez NM, Hamam R, Alfayez M, Kassem M, Aldahmash A, Mahmood A. Transgelin is a TGFbeta-inducible gene that regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of human skeletal stem cells through actin cytoskeleton organization. *Cell death & disease* 2016;7(8):e2321.
15. Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, Kettering K, Weiss C, Munzel T. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: the role of the TGF-beta1 signaling pathway. *International journal of cardiology* 2010;143(3):405-13.
16. Wei W, Jiao Y, Postlethwaite A, Stuart JM, Wang Y, Sun D, Gu W. Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. *Genes and immunity* 2013;14(1):1-6.
17. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A,

- Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowski J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
18. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, Cole KE, De Baere E, Decroos C, Di Donato N, Ernst S, Francey LJ, Gyftodimou Y, Hirashima K, Hullings M, Ishikawa Y, Jaulin C, Kaur M, Kiyono T, Lombardi PM, Magnaghi-Jaulin L, Mortier GR, Nozaki N, Petersen MB, Seimiya H, Siu VM, Suzuki Y, Takagaki K, Wilde JJ, Willems PJ, Prigent C, Gillesen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* 2012;489(7415):313-7.
  19. Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, Hurtado A, Brown GD, Carroll JS, Flicek P, Odom DT. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome research* 2010;20(5):578-88.
  20. Mannini L, F CL, Cucco F, Amato C, Quarantotti V, Rizzo IM, Krantz ID, Bilodeau S, Musio A. Mutant cohesin affects RNA polymerase II regulation in Cornelia de Lange syndrome. *Scientific reports* 2015;5:16803.
  21. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 2008;451(7180):796-801.
  22. Rubio ED, Reiss DJ, Welcsh PL, Disteché CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(24):8309-14.
  23. Nyati S, Schinske-Sebolt K, Pitchiaya S, Chekhovskiy K, Chator A, Chaudhry N, Dosch J, Van Dort ME, Varambally S, Kumar-Sinha C, Nyati MK, Ray D, Walter NG, Yu H, Ross BD, Rehemtulla A. The kinase activity of the Ser/Thr kinase BUB1 promotes TGF-beta signaling. *Science signaling* 2015;8(358):ra1.
  24. Deardorff MA, Wilde JJ, Albrecht M, Dickinson E, Tennstedt S, Braunholz D, Monnich M, Yan Y, Xu W, Gil-Rodriguez MC, Clark D, Hakonarson H, Halbach S, Michelis LD, Rampuria A, Rossier E, Spranger S, Van Maldergem L, Lynch SA, Gillesen-Kaesbach G, Ludecke HJ, Ramsay RG, McKay MJ, Krantz ID, Xu H, Horsfield JA, Kaiser FJ. RAD21 mutations cause a human cohesinopathy. *American journal of human genetics* 2012;90(6):1014-27.
  25. Thakur SS, Geiger T, Chatterjee B, Bandilla P, Frohlich F, Cox J, Mann M. Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2011;10(8):M110.003699.
  26. Prunotto M, Bruschi M, Gunning P, Gabbiani G, Weibel F, Ghiggeri GM, Petretto A, Scaloni A, Bonello T, Schevzov G, Alieva I, Bochaton-Piallat ML, Candiano G, Dugina V, Chaponnier C. Stable incorporation of alpha-smooth muscle actin into stress fibers is dependent on specific tropomyosin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)* 2015;72(6):257-67.
  27. Je HD, Sohn UD. SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice. *Molecules and cells* 2007;23(2):175-81.
  28. Wang J, Huang Y, Ning Q. Review on regulation of inwardly rectifying potassium channels. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2011;21(4):303-11.

29. Qi XY, Huang H, Ordog B, Luo X, Naud P, Sun Y, Wu CT, Dawson K, Tadevosyan A, Chen Y, Harada M, Dobrev D, Nattel S. Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circulation research* 2015;116(5):836-45.
30. Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annual review of physiology* 1996;58:363-94.
31. Huang X, Lee SH, Lu H, Sanders KM, Koh SD. Molecular and functional characterization of inwardly rectifying K(+) currents in murine proximal colon. *The Journal of physiology* 2018;596(3):379-91.
32. Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 2002;21(35):5380-7.
33. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics* 2012;13(7):484-92.
34. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR, Ren B. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell stem cell* 2010;6(5):479-91.
35. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer cell* 2014;26(4):577-90.
36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2014;30(15):2114-20.
37. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 2012;9(4):357-9.
38. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009;25(9):1105-11.
39. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2014;30(7):923-30.
40. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2010;26(1):139-40.
41. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* 2015;43(7):e47.
42. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, Moulton HM, DeJesus P, Che J, Mulder LC, Yanguéz E, Andenmatten D, Pache L, Manicassamy B, Albrecht RA, Gonzalez MG, Nguyen Q, Brass A, Elledge S, White M, Shapira S, Hacohen N, Karlas A, Meyer TF, Shales M, Gatorano A, Johnson JR, Jang G, Johnson T, Verschueren E, Sanders D, Krogan N, Shaw M, König R, Stertz S, Garcia-Sastre A, Chanda SK. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell host & microbe* 2015;18(6):723-35.
43. Ong SE, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature protocols* 2006;1(6):2650-60.
44. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* 2008;26(12):1367-72.

45. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 2012;9(7):671-5.
46. Xi Y, Li W. BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping program. *BMC bioinformatics* 2009;10:232.
47. Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, Mason CE. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome biology* 2012;13(10):R87.
48. Feng H, Conneely KN, Wu H. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic acids research* 2014;42(8):e69.
49. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Molecular cell* 2010;38(4):576-89.
50. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009;25(14):1754-60.
51. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 2008;9(9):R137.

## Tables

**Table 1. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed genes in RNAseq at early passage (p8).**

Passage 8			
	Biological functions	p-value	# genes
Upregulated	Cell cycle	2.46E-19	35
	Sister chromatid segregation	2.47E-17	22
	Sister chromatid cohesion	9.62E-10	12
	Extracellular matrix organization	4.45E-04	10
	Actomyosin structure organization	6.47E-04	7
	Chromatin remodeling at the centromere	5.39E-03	3
Downregulated	ABC transporters	8.15E-07	6
	Chemical synaptic transmission	1.42E-04	14
	Behavior	2.54E-04	13
	Actin-mediated cell contraction	8.25E-03	4

**Table 2. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed genes in RNAseq at late passage (p14).**

Passage 14			
	Biological functions	p-value	# genes
Upregulated	Cell cycle	8.46E-64	109
	Sister chromatid segregation	1.60E-49	63
	Sister chromatid cohesion	7.92E-30	37
	Chromatin remodeling	1.40E-06	16
	Histones phosphorylation	1.69E-05	7
	Cardiac muscle fiber development	8.80E-04	3
	Actin filament-based movement	3.21E-03	9
	Cardiac muscle hypertrophy in response to stress	6.36E-03	4
	Developmental growth	9.47E-03	23
Downregulated	Cardiac conduction	1.87E-04	9
	Circulatory system process	5.19E-04	18
	Behavior	5.39E-04	19
	Muscle contraction	7.45E-04	10
	Potassium ion transport	2.20E-03	10
	ABC transporters	3.72E-03	4
	Heart contraction	5.63E-03	10



**Table 3. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed proteins in SILAC at early passage (p8).**

Passage 8		
Biological functions	p-value	# genes
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	1.85E-09	5
Smooth muscle contraction	2.93E-08	4
Supramolecular fiber organization	1.94E-08	8
Cardiac muscle contraction	4.36E-05	3
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	5.26E-05	3
Dilated cardiomyopathy	6.69E-05	3
Actin-mediated cell contraction	1.22E-04	3
Extracellular matrix organization	2.00E-04	4
Response to oxidative stress	5.11E-04	4
Muscle organ development	4.85E-03	3

**Table 4. Biological functions (GO analysis) associated with differentially expressed proteins in SILAC at late passage (p14).**

<b>Passage 14</b>		
<b>Biological functions</b>	<b>p-value</b>	<b># genes</b>
Smooth Muscle Contraction	2.93E-08	4
Muscle contraction	2.93E-05	4
ECM proteoglycans	3.88E-05	3
Cardiac muscle contraction	4.36E-05	3
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	5.26E-05	3
Dilated cardiomyopathy	6.69E-05	3
Striated muscle cell differentiation	9.15E-05	4
Actin-mediated cell contraction	1.22E-04	3
Extracellular matrix organization	1.26E-04	4
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	2.69E-04	3

**Table 5. Biological functions (GO analysis) associated with differentially methylated genes in RRBS at early passage (p8).**

Passage 8			
	Biological functions	p-value	# genes
Hypermethylated	Neuronal system	7.21E-14	73
	Regulation of membrane potential	1.04E-06	60
	Behavior	1.24E-06	77
	Regulation of heart contraction	6.91E-05	37
	Muscle contraction	9.72E-05	48
	Cellular potassium ion transport	1.76E-04	31
	Midgut development	8.59E-04	5
	Neuromuscular process	2.58E-03	21
	Smooth muscle contraction	3.42E-03	3
Hypomethylated	Embryonic morphogenesis	7.81E-06	15
	Heart morphogenesis	3.24E-05	9
	Cardiovascular system development	1.41E-04	15
	Heart looping	6.29E-04	4
	Embryonic heart tube development	1.63E-03	3
	Regulation of developmental growth	4.80E-03	7
	Negative regulation of MAPK cascade	5.78E-03	5
	Actin filament-based process	6.78E-03	11

**Table 6. Biological functions (GO analysis) associated with differentially methylated genes in RRBS at late passage (p14).**

Passage 14			
	Biological functions	p-value	# genes
Hypermethylated	Neuronal system	4.82E-06	39
	Cardiac conduction	2.49E-05	20
	Muscle contraction	6.85E-05	24
	Behavior	3.19E-04	47
	Regulation of membrane potential	4.19E-04	36
	Cellular potassium ion transport	8.25E-04	21
	Midgut development	1.39E-03	4
	Actin filament-based process	1.39E-03	50
	Hindgut development	5.34E-03	3
Hypomethylated	Embryonic morphogenesis	4.52E-04	12
	Regulation of embryonic development	1.33E-03	5
	Regulation of cellular response to stress	1.38E-03	12
	Chromatin organization	2.23E-03	7
	Negative regulation of response to wounding	2.24E-03	4
	Heart morphogenesis	4.98E-03	6
	Pathway-restricted SMAD phosphorylation	2.47E-03	3
	Muscle structure development	9.26E-03	10

**Table 7. Biological functions (GO analysis) associated with Tn5 peaks in ATAC-seq at early passage (p8).**

Passage 8			
	Biological functions	p-value	# genes
Less open	Inwardly rectifying K <sup>+</sup> channels	5.80E-04	3
	Neuronal system	3.49E-03	7
	Actin filament-based process	3.88E-03	10
	Action potential	6.38E-03	4
	Potassium ion transport	8.71E-03	5
3 More open	Regulation of nervous system development	5.31E-05	13
	Apoptotic process involved in development	5.30E-04	3
	Developmental growth	1.85E-03	9
	Negative regulation of intracellular signal transduction	3.20E-03	8
	Limb development	8.81E-03	4

**Table 8. Biological functions (GO analysis) associated with Tn5 peaks in ATAC-seq at late passage (p14).**

Passage 14			
	Biological functions	p-value	# genes
Less open	Protein kinase A signaling	1.45E-04	4
	Actin filament-based process	1.31E-03	14
	Heart development	3.53E-03	11
	Cellular potassium ion transport	5.36E-03	6
	Neuronal system	9.25E-03	8
3 More open	Vasculogenesis	5.64E-06	6
	Cardiovascular system development	9.39E-04	12
	Develomental growth	8.39E-03	9
	Muscle tissue development	8.55E-03	7
	Cardiac muscle tissue development	9.31E-03	5

**Table 9. Primers list for RT PCR validations.**

<b>Gene ID</b>	<b>Forward 5' primer sequence</b>	<b>Reverse 3' primer sequence</b>
<i>BUB1</i>	TCAGCCTGGTTTTGAATTCCTC	TACCACAATGACCCAAGATTCA
<i>DUSP2</i>	GTAGCGGAAAAGGCCCTCAA	GTCCCGATCTGTGCTCTGAG
<i>KCND2</i>	CTGGGGTACACACTGAAGAGTT	ACTCAGCGAACAGATAGAACCA
<i>PLK1</i>	CCAACCATTAACGAGCTGCTTA	ACCTGTCTCTCGAACCACTG
<i>SGO1</i>	CTGGAGCTGTCATCACTATTGG	CCAAAGTGAAAGAAGCCCAAGA
<i>SGO2</i>	GAGTGCCCAGTGATGGAAAC	AATGCCCTGTTGTTGTGCTTTA

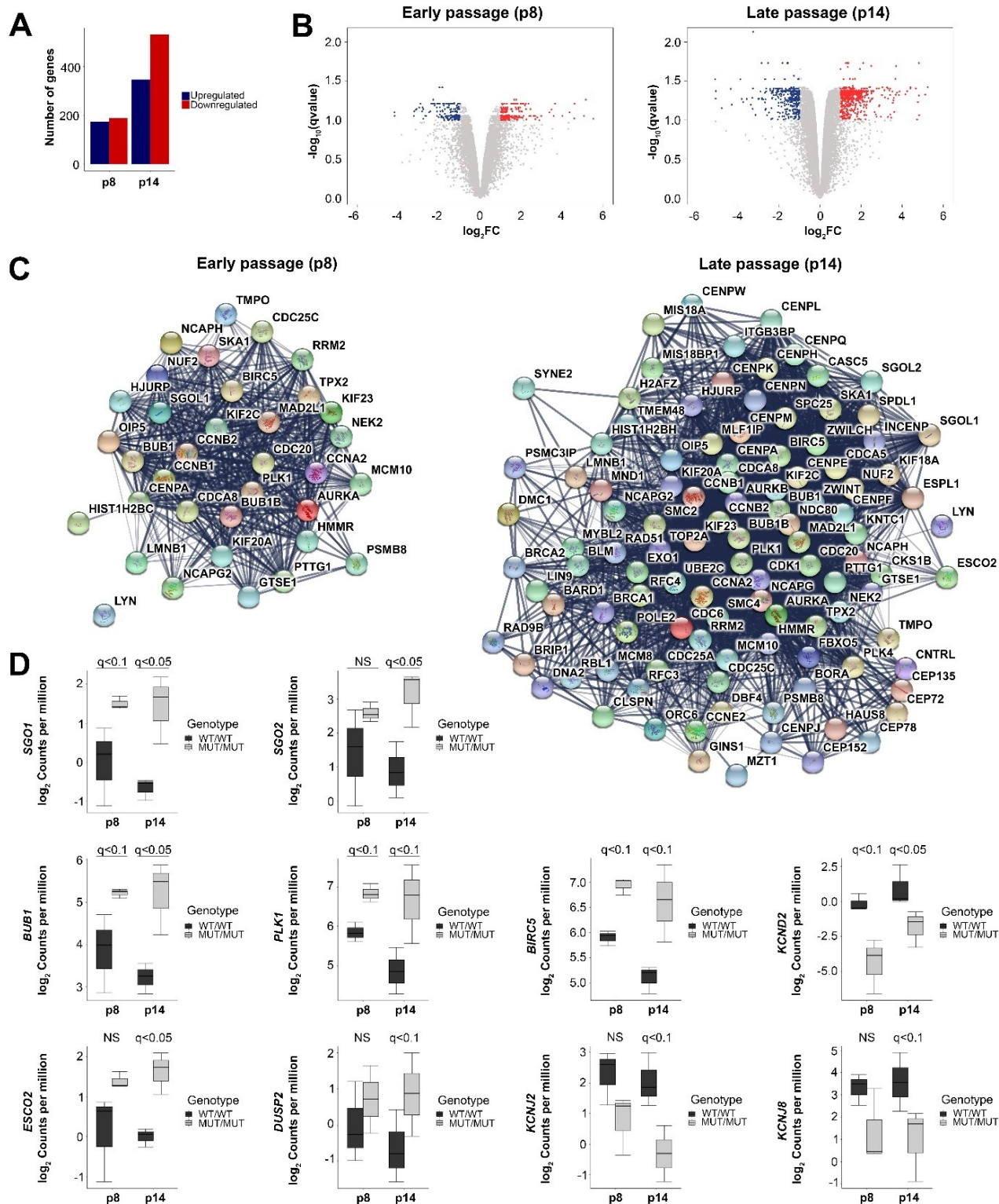
**Table 10. *LINE-1* pyrosequencing primers.**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
Forward 5'	GGGTATAGGGAAGGGAATATTATATATTAG
Reverse 3'	CCATCAACTCACCATCTACATT
Sequencing	AGGGAATATTATATATTAGGGT

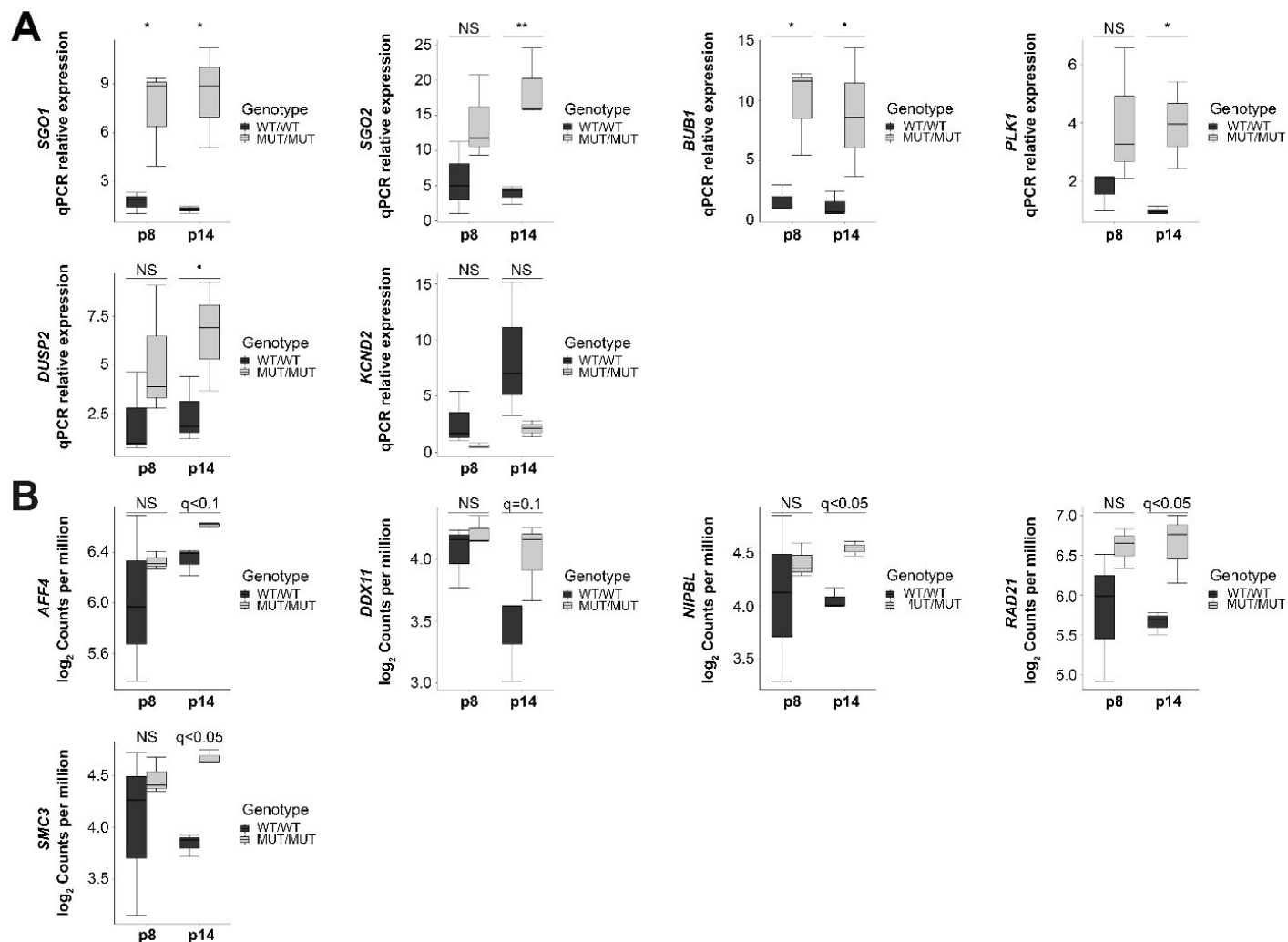
Supplementary Tables are too large to be displayed and can be found online.



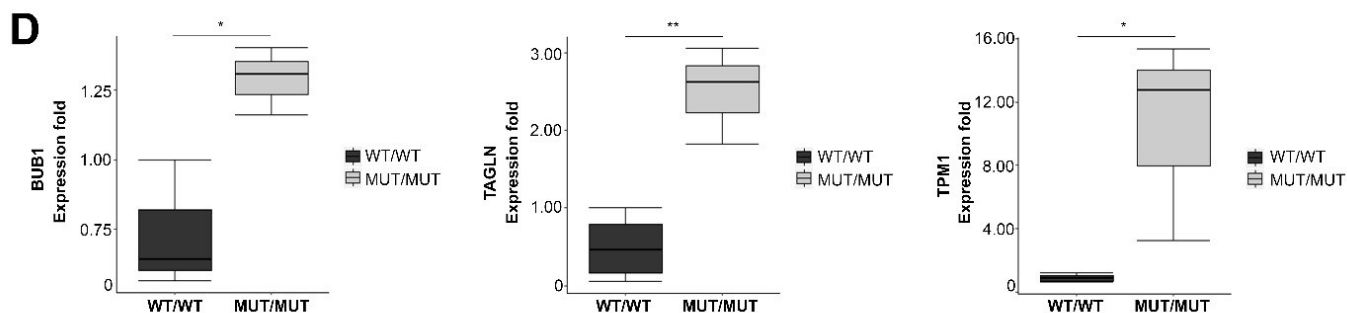
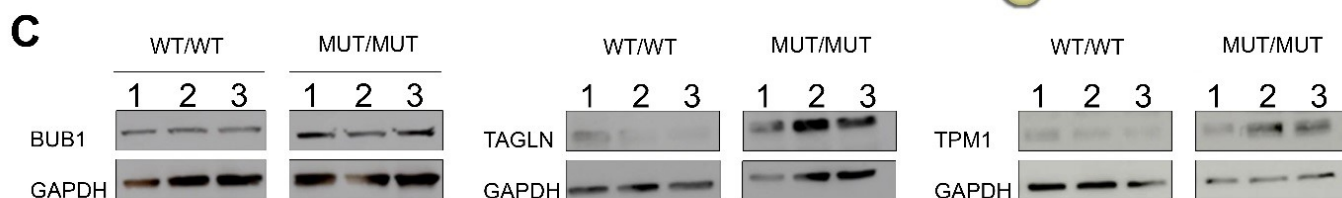
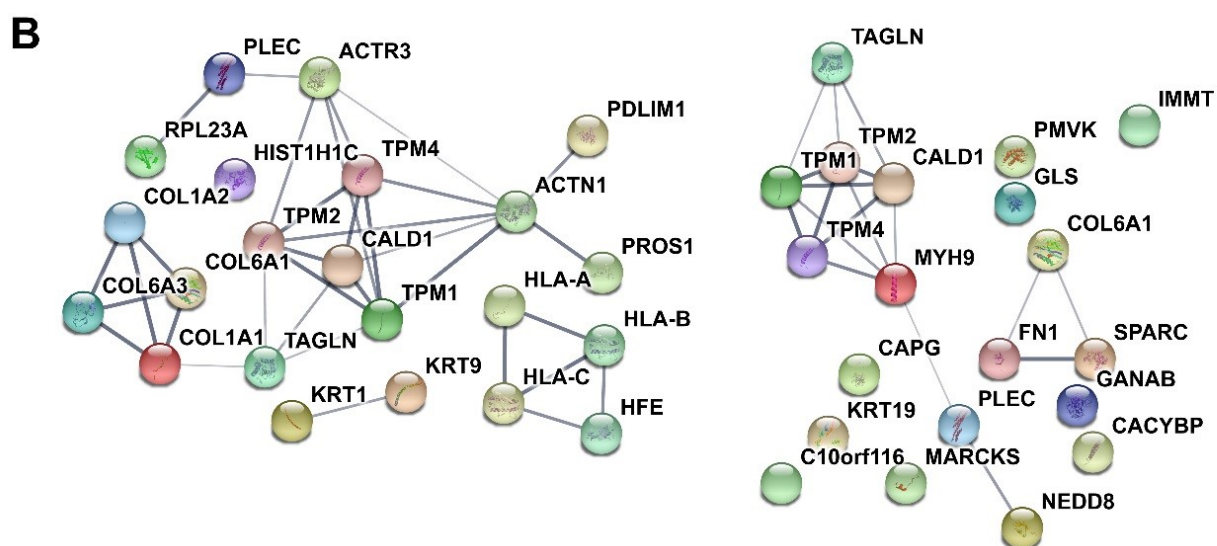
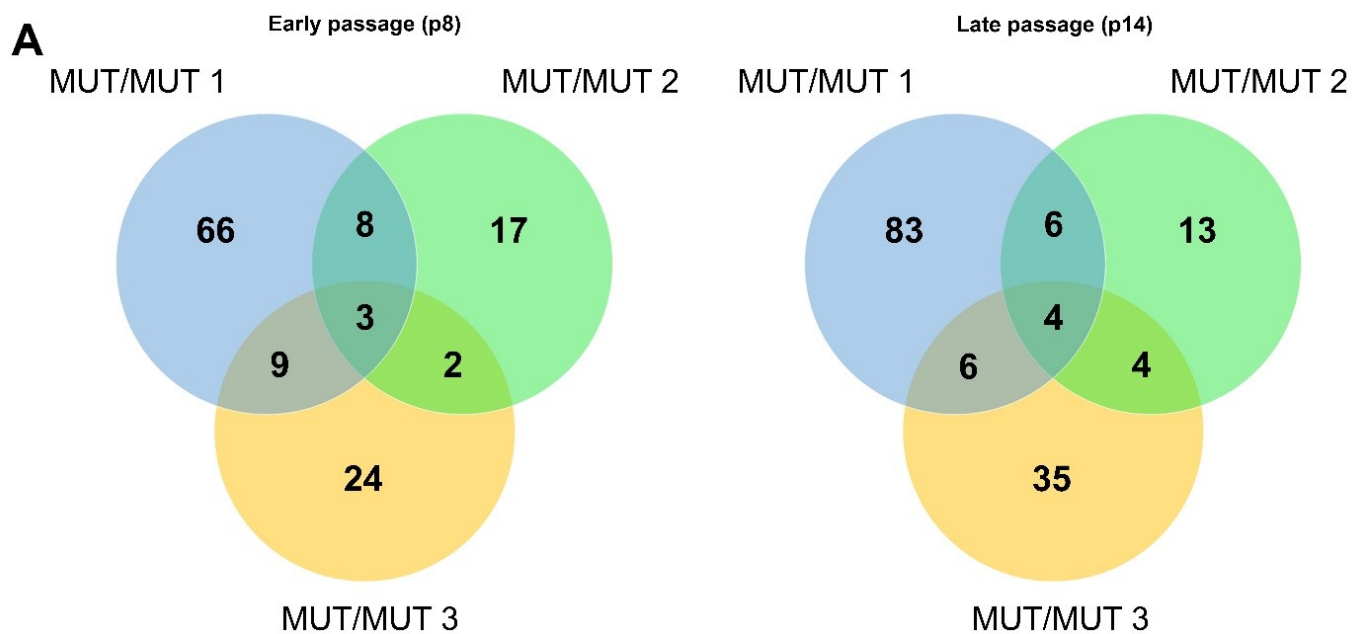
# Figures



**Figure 1. Transcriptomic profiling of CAID patient dermal fibroblasts.** (A) Volcano plot of the differentially expressed genes at early (p8) and late stage (p14). Log2 fold change: blue,  $<-1$ ; red,  $>1$ . (B) Number of up-regulated and down-regulated genes identified at early (p8) and late passage (p14). (C) Cluster of genes associated with cell cycle identified at p8 that became larger at p14. (D) mRNA expression of candidate genes at early (p8) and late passage (p14) showing up-regulation of SGO1, SGO2, BUB1, PLK1, ESCO2, DUSP2, and BIRC5 and down-regulation of KCND2, KCNJ2, and KCNJ8. Error bars signify SD. For each group, N = 3 independent biological replicates. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method (q value). FC, fold change; MUT, K23E; WT, wild-type.

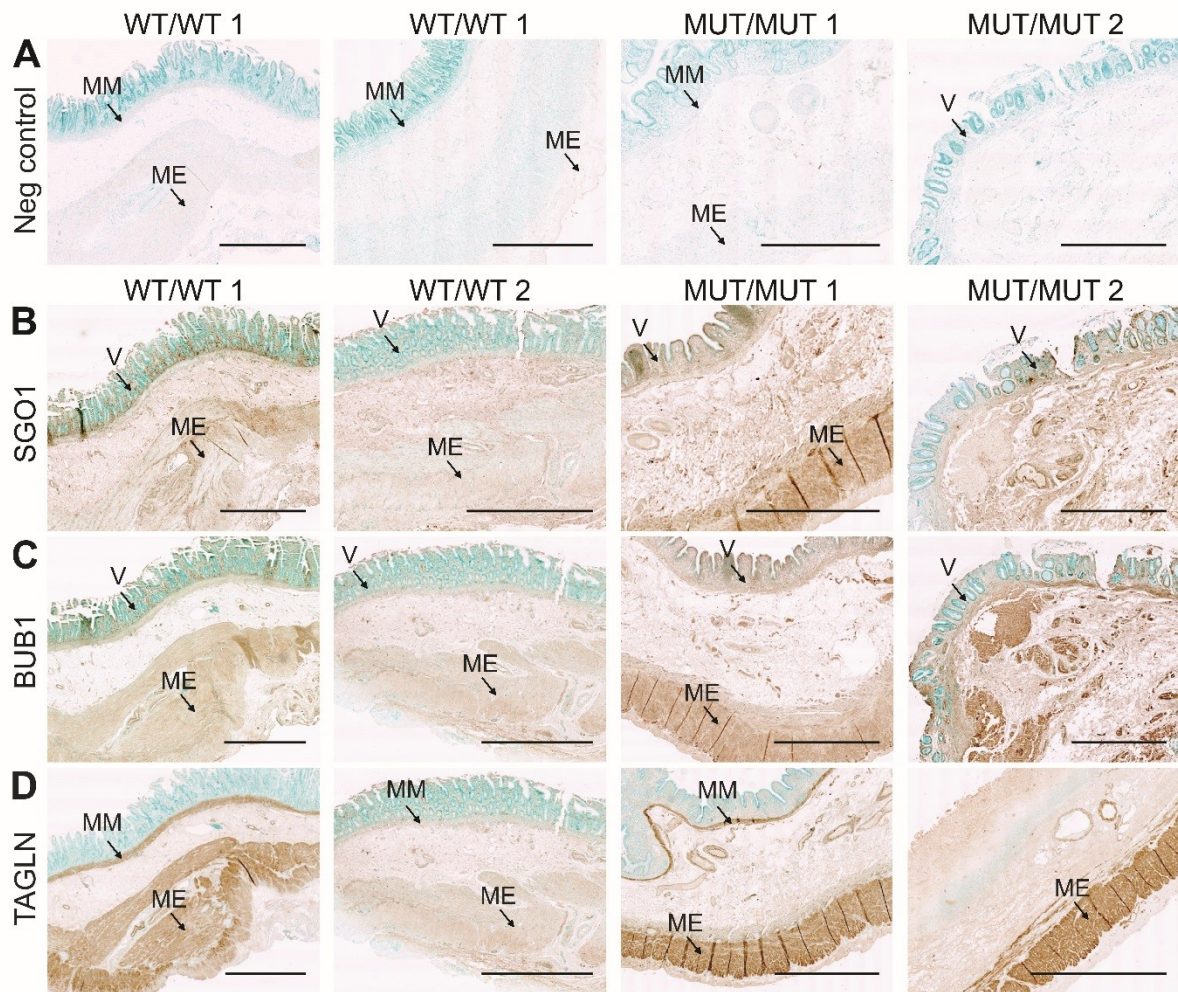


**Figure 2. Candidates validation and expression profile of cohesinopathies genes.** (A) Reverse transcription quantitative PCR (qPCR) validations of SGO1, SGO2, BUB1, PLK1, DUSP2, and KCND2 expression at early (p8) and late (p14) passage. Error bars signify SD. For each condition, the experiment was performed on N = 3 independent biological replicates in technical replicates. Significance was calculated using 1-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*P < .1, \*P < .05, and \*\*P < .01). (B) mRNA expression levels of genes involved in cohesinopathies at early (p8) and late (p14) passage. AFF4, CHOPS syndrome; DDX11, Warsaw breakage syndrome; NIPBL, RAD21, and SMC3, Cornelia de Lange syndrome. Error bars signify SD. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method (q value). For each group, N = 3 independent biological replicates. MUT, K23E; WT, wild-type.



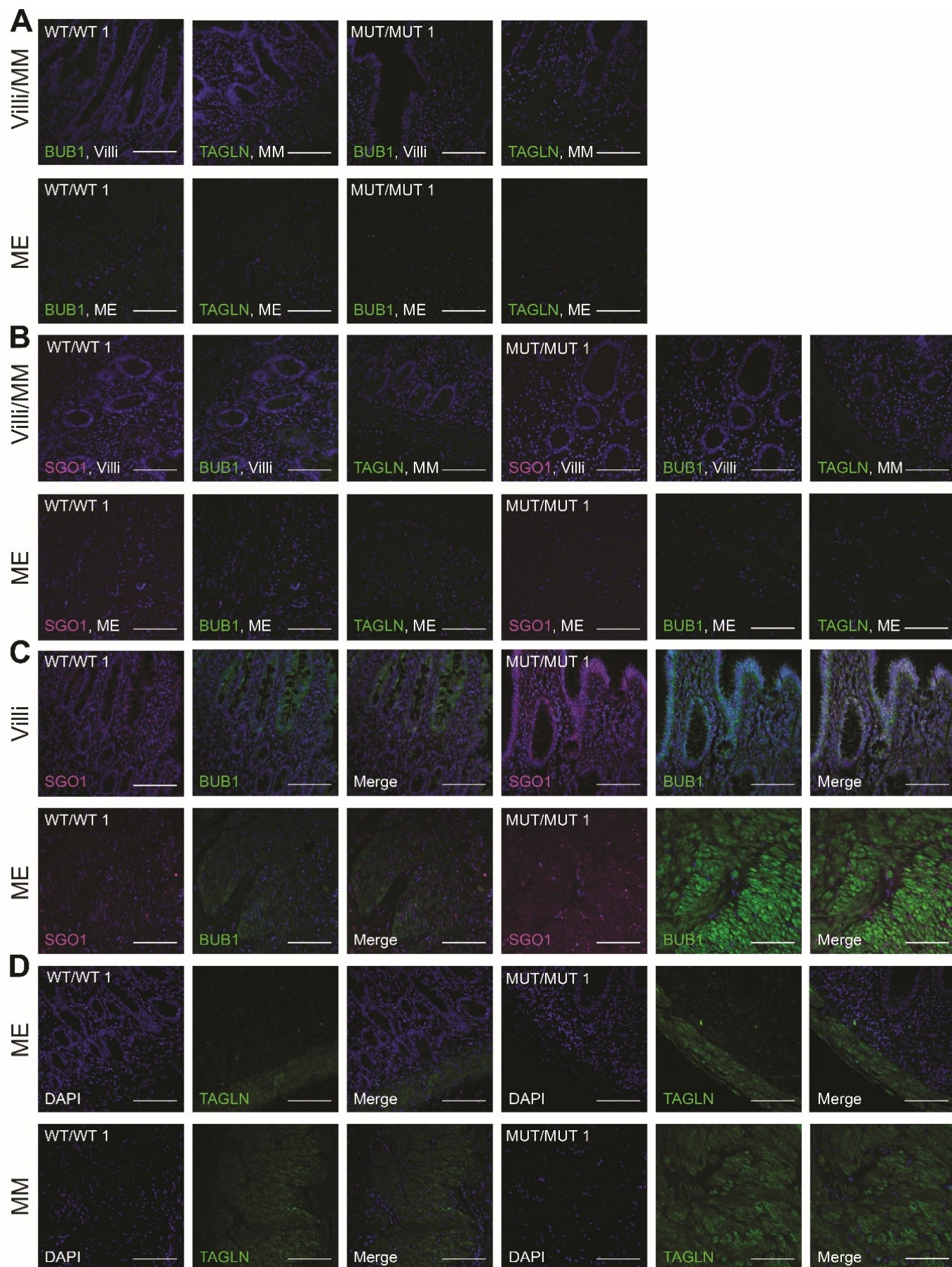
**Figure 3. Proteomic profiling of CAID patient dermal fibroblasts.** (A) Venn diagram of proteins differentially expressed in CAID patient/control duos at early (p10) and late passage (p14). (B) Protein network of differentially expressed proteins in CAID patients at early (p10) and late (p14) passage. N = 3 independent biological replicates were analyzed for each condition. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method (q value). (C) Western blot validation of TPM1, TAGLN, and BUB1 overexpression. (D) Densitometric quantification of BUB1, TAGLN, and TPM1 overexpression by Western blot. Error bars signify SD. For each group, N = 3 independent biological replicates (2 independent experiments). Significance was calculated by 1-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*P < .05, \*\*P < .01). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MUT, K23E; WT, wild-type.





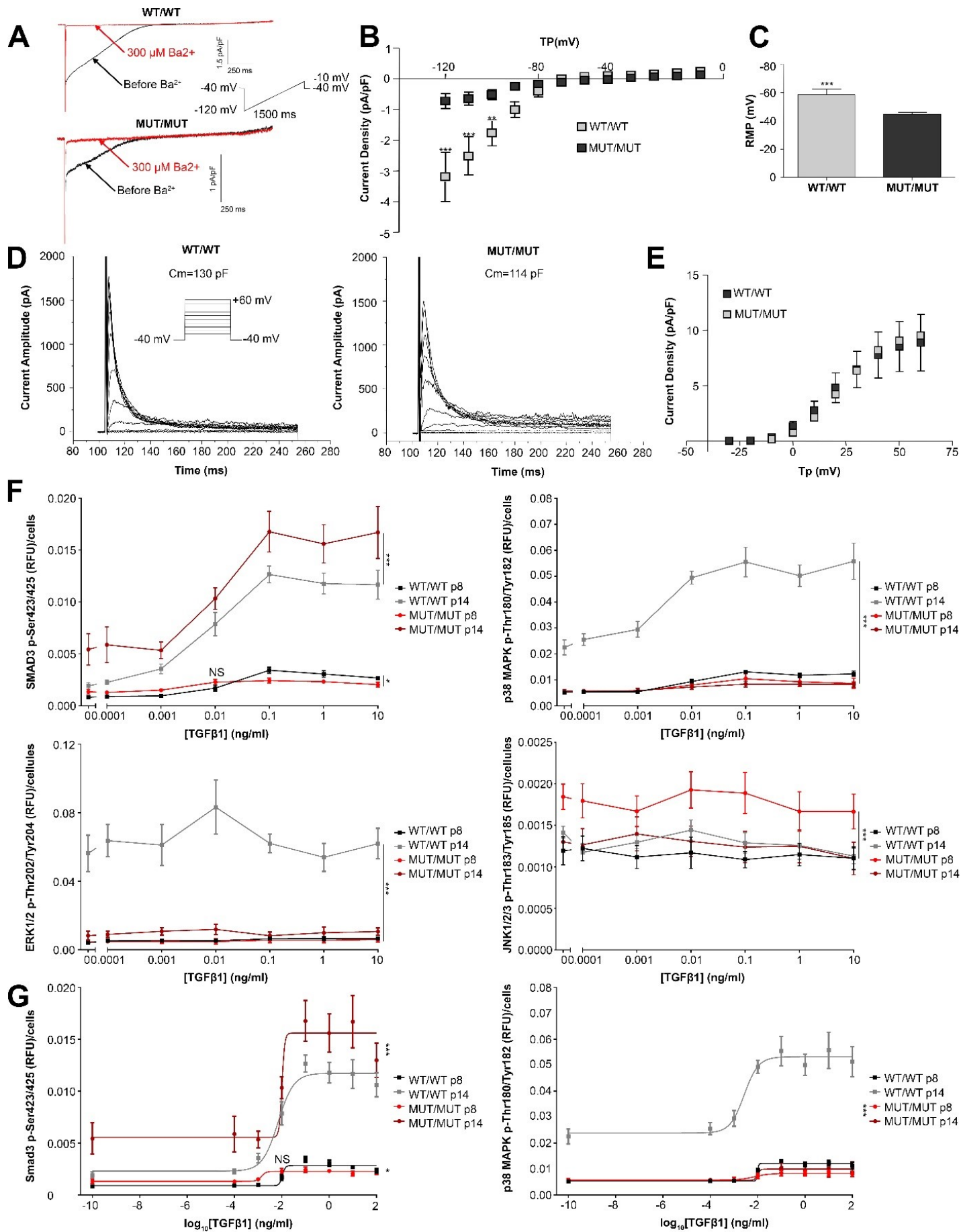
**Figure 4. Gastrointestinal histology of CAID patients.** Biopsy specimens (5  $\mu$ m) from controls and individuals with CAID. All biopsy specimens are oriented to show the villi on top and the muscularis externa at the bottom. (A) Negative controls show that no signal was obtained in the absence of the primary antibody. (B–D) DAB staining was performed for SGO1, BUB1, and TAGLN. (B) SGO1 and (C) BUB1 show higher expression in the villi and muscularis externa of CAID patient intestines vs controls. (D) TAGLN shows higher expression in muscularis mucosa and muscularis externa in CAID patient intestines vs controls (N = 3, 2 shown). Experiment was performed 3 times independently on 3 biological replicates for each condition. The Scale bar is 1000  $\mu$ m except MUT/MUT1 SGO1, BUB1, TAGLN, and MUT/MUT 2 TAGLN where Scale bar: 2000  $\mu$ m. Images were acquired using a Zeiss AxioScan Z1 slide scanner and processed with Zen software. MUT, K23E; WT, wild-type.





**Figure 5. Gastrointestinal fluorescent histology of CAID patients.** Biopsy specimens (5  $\mu$ m) from controls and individuals with CAID. All biopsy specimens are oriented to show the villi on top and the muscularis externa at the bottom. (A) Immunizing peptide blocking experiment showing the specificity of BUB1 and TAGLN antibodies. (B) Negative controls showing that no signal was obtained in the villi (SGO1 and BUB1), the muscularis mucosa (TAGLN), and the muscularis externa (SGO1, BUB1, and TAGLN) in the absence of the primary antibody. (C and D) Fluorescence staining was performed for SGO1, BUB1, and TAGLN. (C) SGO1 and BUB1 expression were higher in the villi and muscularis externa of CAID patient intestines vs controls. In controls, SGO1 expression was mainly nuclear whereas in CAID patients, SGO1 was delocalized to the cytoplasm. (D) TAGLN expression was higher in the muscularis mucosa and the muscularis externa in CAID patient intestines vs controls. V, villi; ME, muscularis externa; MM, muscularis mucosa (N = 3, 2 shown). Experiment was performed 3 times independently on 3 biological replicates for each condition. Scale bar: 100  $\mu$ m. Images were acquired at 40 $\times$  using a Leica DMI8 inverted fluorescence microscope and processed with Leica LAS X software. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. MUT, K23E; WT, wild-type.



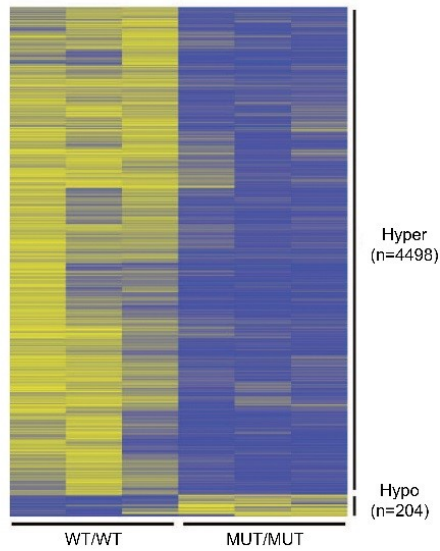


**Figure 6. Electrophysiology of CAID patient dermal fibroblasts and analysis response of the canonical and non-canonical TGF- $\beta$  pathways.** (A) IK1 recordings (at 0.1 Hz) from controls and CAID patient human dermal fibroblasts. Typical response to Ba<sup>2+</sup>. (B) Means  $\pm$  SEM Ba<sup>2+</sup>-sensitive current density vs voltage relationships in controls (n = 8 cells) vs CAID patients (n = 8 cells). Significance was calculated by 2-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*\*P < .01 and \*\*\*P < .001). (C) Means  $\pm$  SEM RMP in controls (n = 8 cells) vs CAID patients (n = 13 cells). Significance was calculated using the Student t test with Bonferroni correction. (D) Time- and voltage-dependent outward currents in human fibroblasts. Outward currents were elicited by 200-ms voltage steps from a holding potential of -40 mV to membrane potentials between -30 to +60 mV. (E) Means  $\pm$  SEM of current density vs voltage relationships for time-dependent outward currents in human fibroblasts. There were no significant differences between controls (n = 11 cells) and CAID patients (n = 18 cells). Significance was calculated by 2-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*\*P < .01 and \*\*\*P < .001). All experiments were replicated 10 times independently with a minimum of 8 cells each time, on N = 1 biological replicate for control, and N = 2 biological replicates for CAID patients. (F) Phosphorylation of SMAD3 was increased significantly at baseline and after stimulation with TGF- $\beta$ 1 in CAID patients (N = 3, n = 6) vs controls (N = 3, n = 6) at early (p8) (0–0.1 ng/mL, NS; 0.01–10 ng/mL, P < .001) and late passage (p14) (P < .001). Phosphorylation of p38 and ERK1/2 was increased significantly in controls (N = 3, n = 6) at p14, but not in CAID patients (N = 3, n = 6). At early passage (p8) controls and CAID patients were not sensitive to ligand stimulation. Phosphorylation analysis of JNK1/2/3 showed that controls (N = 3, n = 6) and CAID patients (N = 3, n = 6) were not sensitive to ligand stimulation for both passages studied. Significance was calculated by 2-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*P < .01, and \*\*\*P < .001). (G) Dose-response analysis of the canonical (SMAD3) and non-canonical (p38) TGF- $\beta$  pathway. (N = 3, n = 6). Significance was calculated by 2-way analysis of variance with the Bonferroni post-test (\*P < .01, and \*\*\*P < .001). All experiments were performed 4 times independently. MUT, K23E; WT, wild-type.

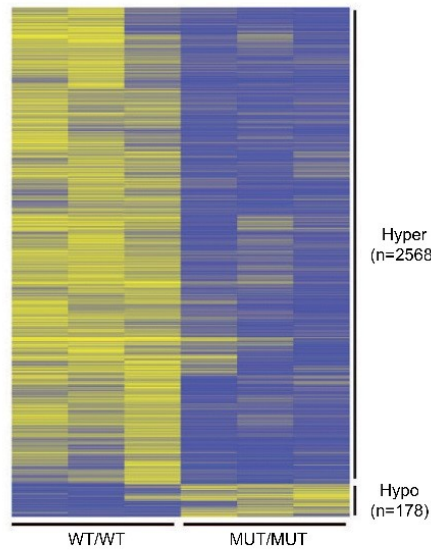
**A** Early passage (p8)

Methylation level (%)

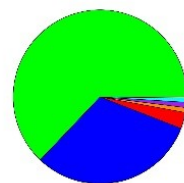
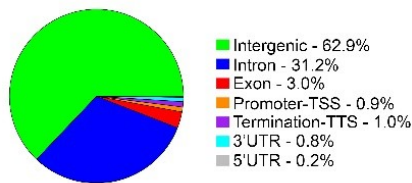
0 25 50 75 100



Total tiles = 4702

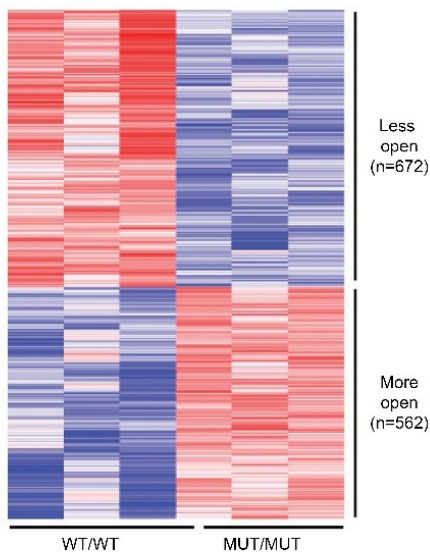
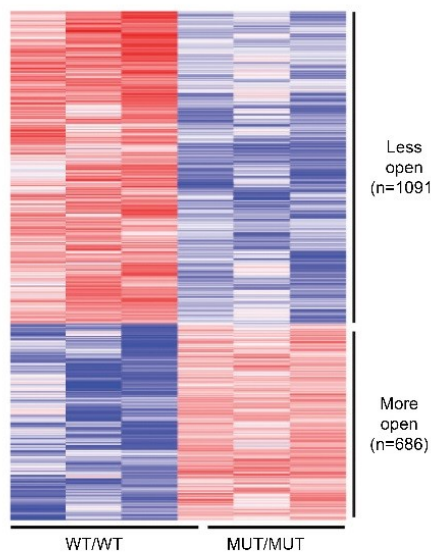
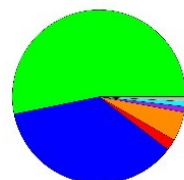
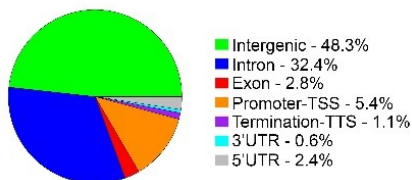
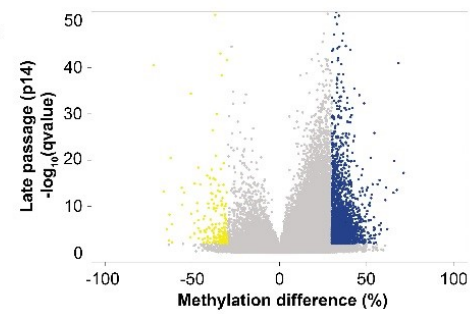
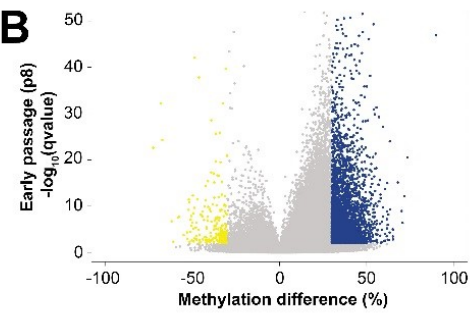
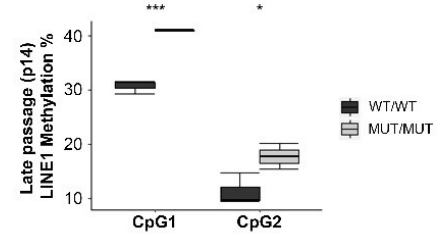
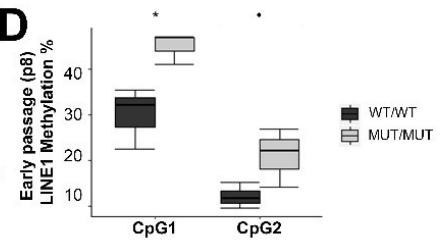
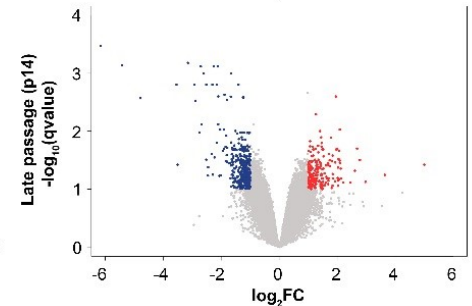
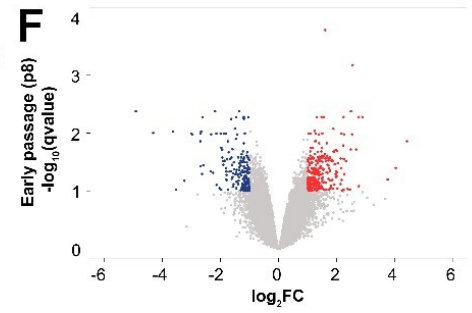
**Late passage (p14)**

Total tiles = 2746

**C****Early passage (p8)**

**E** Tn5 insertion rate (standardized)

-3 0 3

**Late passage (p14)****F****B****D****F**

**Figure 7: Epigenetic profile of CAID patients.** (A) Heatmap representation of methylation levels in CAID patients vs controls among all tiles at early (p8) and late stage (p14) showed a global hypermethylation pattern. (B) Volcano plot of the methylation difference (%) at early (p8) and late stage (p14). Yellow  $\geq -30\%$  and blue  $\geq 30\%$  methylation differences. (C) Tile proportions of differentially methylated regions at early (p8) and late stage (p14). For each group, N = 3 independent biological replicates. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method (q value). (D) Methylation percentage of LINE-1 CpG sites assessed by pyrosequencing. LINE-1 CpGs are significantly more methylated in CAID patients than in controls. Error bars signify SD. For each condition, the experiment was performed on N = 3 independent biological replicates in technical replicates. Significance was calculated by 1-way analysis of variance with the Bonferroni post-test ( $\bullet P < .1$ ,  $*P < .05$ , and  $***P < .001$ ). (E) Heatmap representation of chromatin compaction level in CAID patients vs controls among all tiles at early (p8) and late stage (p14). (F) Volcano plot of the log<sub>2</sub> fold change of Transposase differential peaks at early (p8) and late stage (p14). Blue, log<sub>2</sub> fold change  $< -1$ ; red, log<sub>2</sub> fold change  $> 1$ . (G) Proportion of Transposase differential peaks at early (p8) and late stage (p14). For each group, N = 3 independent biological replicates. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method (q value). MUT, K23E; TSS, transcription starting site; TTS, transcription termination site; UTR, untranslated region; WT, wild-type.

## Chapitre 5: Discussion et conclusion

L'objectif général de cette thèse était de caractériser les conséquences fonctionnelles de la mutation *SGO1* K23E au niveau des fibroblastes de peau de patients CAID (le seul modèle d'étude disponible) en fonction de l'âge (précoce ou tardif) en utilisant le criblage transcriptomique, protéomique et épigénétique, et ce afin, de dresser la signature moléculaire du syndrome CAID in vivo à toutes les étapes du dogme central de la biologie moléculaire. Bien que les manifestations cliniques associées au syndrome CAID et que la mutation causale soient connus, les mécanismes moléculaires sous-jacents étaient inconnus. D'autre part, les manifestations cliniques observées dans le syndrome CAID ne peuvent être expliquées par la perturbation des rôles canoniques de SGO1 dans le cycle cellulaire, suggérant ainsi que la pathologie de CAID est due à de nouveaux rôles non canoniques de SGO1. L'effet de la mutation *SGO1* K23E sur une voie de signalisation déjà connue comme étant impliqué dans ce syndrome ainsi que dans les arythmies en général, soit la voie de signalisation TGF- $\beta$ , a aussi été étudié plus en détails au niveau canonique et non canonique. Nos travaux ont également permis de caractériser le syndrome CAID dans le spectre des cohésinopathies et d'émettre des hypothèses plausibles quant aux mécanismes communs en se basant sur leurs différences et leurs ressemblances. En combinant cette caractérisation aux résultats de nos analyses, nous proposons un modèle mécanistique mettant en évidence plusieurs voies de signalisation impliquées dans le syndrome CAID, mais aussi certaines voies pouvant être des cibles thérapeutiques intéressantes, soit la voie de signalisation TGF- $\beta$  et la méthylation de l'ADN, puisque des médicaments ciblant ces voies existent.

### 5.1 – Le syndrome CAID dans le spectre des cohésinopathies

Au cours des dernières années, de nouveaux rôles non reliés à la cohésion du complexe de la cohésine et de ses partenaires ont été découverts, soit la régulation des points de contrôle et de réparation des dommages à l'ADN, la régulation de la transcription génique et la structure de la chromatine (270). En comparant les différents phénotypes des cohésinopathies, notre hypothèse est que ce sont les rôles indépendants de la cohésion du complexe de la cohésine qui sont impliqués dans les mécanismes pathologiques associés puisque les patients atteints de

cohésinopathies présentent principalement des phénotypes développementaux avec des défauts dans le cycle cellulaire légers ou inexistantes qui ne sont pas suffisants pour provoquer un phénotype délétère (1, 335, 336). Cette hypothèse est compatible avec le fait que les patients atteints de cohésinopathies présentent principalement des phénotypes du développement alors que les anomalies du cycle cellulaire sont légères ou tout simplement absentes (1, 335, 336). Depuis un moment déjà, l'étude des troubles monogéniques indique que leur complexité est plus importante qu'il n'y paraît et que les phénotypes associés peuvent résulter d'une perturbation de multiples voies plutôt que d'une cascade unique (337-340). En effet, des phénotypes très différents peuvent être expliqués par la variation allélique d'un seul gène (338, 341). De plus, dans les maladies monogéniques, la pénétrance est réduite et l'expressivité est variable, en partie dû au fait que les gènes modificateurs et les facteurs non génétiques peuvent aussi contribuer aux phénotypes de ces troubles (337, 338).

Étant donné que le complexe de la cohésine régule l'expression des gènes impliqués dans plusieurs voies, y compris celles impliquées dans le développement, les mutations des composants du complexe de la cohésine sont susceptibles d'altérer la structure de la chromatine, entraînant des défauts de développement (342-344). En effet, des études effectuées chez la drosophile ont montré que certains facteurs du complexe de la cohésine, soient NIPBL, RAD21, SMC1, STAG et PDS5 (Androgen-Induced Proliferation Inhibitor), contrôlent l'identité segmentale, le développement des membres et du système nerveux (343). De plus, il a été démontré que la perte de PDS5B (l'un des deux gènes PDS5) chez la souris cause la létalité périnatale et des anomalies développementales semblables à celles retrouvées dans la CdLS (345). Il semble donc plausible que les facteurs du complexe de la cohésine régulent également l'expression des gènes impliqués dans le développement chez les autres mammifères, incluant l'humain. Par ailleurs, ces études ont également mis en évidence l'importance du dosage génique des composants du complexe de la cohésine sur l'expression des gènes impliqués dans le développement, un concept qui est également retrouvé chez certaines cohésinopathies (343). Dans les cas de CdLS, les patients avec des mutations faux-sens ont un phénotype moins sévère que ceux ayant des mutations non-sens ou de larges délétions (346). Le syndrome CAID semble également sensible au dosage génique, mais d'une façon différente. L'analyse des fibroblastes de sujet hétérozygotes pour la mutation K23E a montré qu'au niveau cellulaire, ces derniers ont

un phénotype intermédiaire entre les contrôles et les sujets homozygotes en ce qui à trait à la prolifération, le nombre de cellules en mitose, la sénescence, et l'activation de la voie TGF- $\beta$  en plus de présenter un patron d'expression de SGO1 très semblable à celui des homozygotes (Annexes 1 et 2). Or, le syndrome CAID est un syndrome autosomal récessif. Par conséquent, les sujets hétérozygotes ne sont pas atteints. Cependant, certains d'entre eux ont présenté certaines caractéristiques du syndrome CAID sans toutefois avoir le phénotype complet. Le dosage génique représente la meilleure explication plausible pour ce phénotype intermédiaire.

Par ailleurs, nos analyses de RNAseq ont également identifié une surrégulation significative de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, incluant certains gènes impliqués dans les cohésinopathies, soit les gènes *ESCO2* (RBS), *RAD21* (POIC) et *SMC3* (CdLS), ainsi qu'une tendance à la surrégulation des gènes *AFF4* (CHOPS), *DDX11* (WABS) et *NIPBL* (CdLS) à passage tardif seulement (Section 4.2). Or, dans le cadre des cohésinopathies, la mutation de ces gènes cause une perte de fonction qui entraîne les conséquences cliniques observées, alors que dans notre cas, nous avons trouvé une surrégulation de ces gènes, indiquant plutôt l'éventualité d'un mécanisme causal ou compensatoire afin de mieux prévenir le trouble. L'effet de ces surrégulations n'est pas très clair, mais soulève une fois de plus l'importance du dosage génique dans le mécanisme des cohésinopathies puisqu'autant la surrégulation que la sous-régulation semblent avoir des effets pathologiques.

## **5.2 – Caractérisation du transcriptome du syndrome CAID**

Au début de cette étude, la seule piste moléculaire que nous avions était la mutation *SGOI* K23E. De ce fait, nous avons entrepris une approche exploratoire basée sur des techniques d'analyse bien établies au cours de laquelle nous avons étudié l'effet de la mutation *SGOI* K23E à chaque étape du dogme de la biologie moléculaire afin d'avoir une vue d'ensemble des différents changements causés par cette dernière dans les fibroblastes de peau de patients atteints du syndrome CAID.

Au niveau des ARNm, plusieurs gènes étaient différentiellement exprimés entre les patients CAID et les contrôles, en particulier lors du passage tardif (p14), ce qui suggère que le syndrome CAID est un trouble résultant d'une dérégulation transcriptionnelle (Figure 1B et 1C, Chapitre 4). L'analyse des 10 gènes les plus différentiellement exprimés à la hausse et à la baisse

pour les deux passages étudiés a permis de mettre en évidence l'implication possible de certains mécanismes dans la pathologie du syndrome CAID, incluant la conduction cardiaque et la contraction musculaire, ce qui était attendu, mais aussi dans la réponse immunitaire (Annexe 3). Cette dernière a également été identifiée au cours des études protéomiques dont il sera question à la section 5.3. Mais quel pourrait être le rôle de la réponse immunitaire dans le syndrome CAID? Fait intéressant, dans notre cohorte, un patient CAID est également atteint de sarcoïdose, une maladie inflammatoire rare qui se caractérise par la formation d'amas de cellules immunitaires appelés granulomes (347). La sarcoïdose peut toucher n'importe quel organe. Au niveau du cœur, la formation de granulomes dans le myocarde ventriculaire peut causer des anomalies d'automatisme, entraînant ainsi des problèmes d'arythmie (347). Bien que le mécanisme en cause soit peu connu, il semble qu'une activation accrue du système immunitaire soit responsable de la formation des granulomes qui provoquent ensuite l'inflammation de l'organe cible (347, 348). L'accumulation de cellules T activées a été observée au niveau des granulomes (349). Ceci concorde avec les gènes surrégulés identifiés dans le syndrome CAID qui font majoritairement partie du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), soit le complexe responsable de la présentation des antigènes aux lymphocytes T (350). De plus, un marqueur des lymphocytes T à passage précoce, soit CD4 (surrégulation de 3.19), a aussi été identifié, suggérant la présence d'un plus grand nombre de lymphocytes T chez les patients, ce qui pourrait expliquer la formation des granulomes. Pour ce qui est des phénotypes spécifiques du syndrome CAID, la surrégulation de la réponse immunitaire et l'inflammation pourrait être une explication plausible de l'inflammation chronique observée dans l'intestin. Toutefois, la spécificité de l'organe affecté engendre certaines questions. Pourquoi l'inflammation est-elle uniquement restreinte au niveau de l'intestin alors qu'elle devrait être observée ailleurs? Que se passe-t-il au niveau du cœur? L'inflammation pourrait expliquer, en partie, les signes et symptômes du syndrome CAID, mais quel est le mécanisme impliqué? Ces questions constituent une hypothèse intéressante et inexplorée qui pourrait être exploitée dans les recherches futures sur le syndrome CAID.

La découverte la plus frappante, mais aussi la plus inattendue, repose sur l'identification de la surrégulation d'un nombre impressionnant de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire à passage précoce (35 gènes) et à passage tardif (109 gènes), incluant *SGOI* lui-même,



*SGO2*, ainsi que ses interacteurs directs, *BUB1* et *PLK1*. Il est tout à fait surprenant de trouver autant de dérangements dans un processus aussi sensible que le cycle cellulaire sans qu'aucune létalité ni défaut mitotique/méiotique majeur n'aient été identifiés chez les patients atteints de CAID. Ce résultat pourrait s'expliquer par une altération de la régulation de transcription par le complexe de la cohésine. Toutefois, il n'y a aucune certitude à savoir si le patron de gènes différentiellement exprimés est la cause ou la conséquence de cette surrégulation du cycle cellulaire. L'hypothèse la plus plausible serait que l'accumulation de *BUB1*, qui est responsable de la localisation centromérique de *SGO1*, cause une accumulation de *SGO1* dans cette région et dérègle le mécanisme de cohésion centromérique. Un recrutement accru de *PP2A* par *SGO1* empêcherait la phosphorylation de la sous-unité *SA* par *PLK1* causant le maintien de la cohésion et possiblement l'arrêt mitotique. La surrégulation de *PLK1* serait, dans ce cas, une tentative pour rétablir l'équilibre de ce mécanisme. Toutefois, ce n'est pas ce qui est observé. En effet, les fibroblastes CAID présentent plutôt un phénotype inverse. Des défauts de cohésion centromérique et une légère accélération du cycle cellulaire et ce, sans aucun effet sur le bon déroulement de la mitose ni sur l'intégrité du génome ont été observés (1). Nous avons aussi décrit deux femmes homozygotes, qui ont réussi à mener à terme des grossesses spontanées (1). Ainsi, les dysfonctionnements mitotiques ou méiotiques ne semblent pas être au premier plan dans le syndrome CAID. Cette hypothèse est supportée par le fait que la mutation *SGO1* K23E cause une délocalisation cytosolique de l'expression de *SGO1* plutôt qu'une accumulation au niveau du noyau, et ce, sans causer de défaut mitotique comme mentionné précédemment (1). Ceci suggère que la quantité de *SGO1* restante dans le noyau semble suffisante pour assurer ses fonctions mitotiques. L'analyse *in silico* de la séquence de *SGO1* avec le logiciel de prédiction de signaux de localisation nucléaire (NLS), *NLS Stradamus*, a montré que la mutation K23E se trouve dans un NLS potentiel, ce pourrait expliquer cette délocalisation. De ce fait, il semble plus probable que ce soient des rôles non canoniques de *SGO1* au niveau du cytoplasme qui soient responsables des manifestations cliniques observées dans le syndrome CAID. Toutefois, le rapport de causalité ou compensation n'est pas très clair. Ces rôles possibles seront décrits plus en détails à la section 5.6. Il est également possible que les différentes isoformes de *SGO1* soient affectées différemment par la mutation K23E et soient impliquées différemment dans ces rôles non canoniques bien que la mutation K23E se trouve dans une région commune à tous.

Des études sont présentement en cours au laboratoire pour évaluer l'effet de la mutation K23E sur les différentes isoformes de SGO1 dans des modèles cellulaires.

Pour ce qui est de la surrégulation de *SGO2*, il est possible qu'il s'agisse d'un mécanisme compensatoire. *SGO2* est principalement impliquée dans la méiose, mais il est possible que la quantité de SGO1 au niveau du noyau soit insuffisante pour assurer correctement ses fonctions et que celles-ci soient reprises ou soutenues, en partie, par *SGO2*. De ce fait, le mécanisme de protection centromérique serait différent. Dans les régions centromériques, SGO1 recrute PP2A pour empêcher la phosphorylation de la sous-unité SA du complexe de la cohésine par PLK1. En revanche, dans le cas de *SGO2*, bien qu'il y ait également recrutement de PP2A, la phosphorylation de REC8 (analogue de la sous-unité SA au cours de la méiose) ne dépend pas de PLK1, mais d'autres kinases inconnues (267). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer le rôle précis de cette surrégulation de *SGO2*.

La surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a aussi été identifiée dans une autre cohésinopathie, soit chez la déficience intellectuelle STAG2 lié à l'X (335). Les fibroblastes des patients atteints présentent un plus au taux de cellules en mitose, ce qui est également le cas dans le syndrome CAID (335). Une surrégulation de l'ARNm de STAG2, une surexpression de la protéine associée ainsi qu'une dérégulation du réseau des gènes neuronaux ont aussi été identifiées chez les patients avec microduplication ou triplication de STAG2, ce qui constitue une découverte significative considérant le phénotype de ces patients (351). Bien que ce syndrome soit cliniquement très distinct du syndrome CAID, ceci suggère l'existence d'un pathomécanisme semblable entre ces deux cohésinopathies, qui au lieu de passer par la dérégulation du réseau de gènes neuronaux dans le syndrome CAID, passerait plutôt par la surrégulation de SGO1 et la dérégulation des réseaux de gènes impliqués dans la conduction cardiaque et la régulation du tractus gastro-intestinal.

### **5.3 – Caractérisation du protéome du syndrome CAID**

Au niveau protéique, le mécanisme de contraction des muscles lisses a été mis en avant-plan comme pathomécanisme potentiel des manifestations cliniques du syndrome CAID. L'identification de la surexpression des gènes *TPM1*, 2 et 4 (Tropomyosin 1/2/4), *CALDI* (Caldesmon) et *TAGLN* suggère qu'un déséquilibre entre les contractions des muscles lisses

dépendante et indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans les défauts contractiles observés chez les patients CAID. Les TPMs, en collaboration avec CALD1 régulent la contraction cardiaque et des muscles lisses via la stabilisation du cytosquelette d'actine selon un mécanisme qui dépend du  $\text{Ca}^{2+}$  (352). TAGLN, quant à elle, est une calponine qui régule possiblement la contractilité du cytosquelette d'actine contraction via un mécanisme indépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  (353). En effet, des études effectuées sur des souris ont montré que le knock-out de TAGLN inhibe significativement la contractilité vasculaire  $\text{Ca}^{2+}$  indépendante, mais pas la contractilité  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (354). Ainsi, la surexpression des TPMs, de CALD1 et de TAGLN pourrait être un processus plausible pour contourner les défauts de contraction (POIC myogénique) résultant de la perturbation et de la fibrose des muscles lisses observées chez les patients CAID (1). Le mécanisme en jeu pourrait être le suivant : en temps normal, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , TPM1 et CALD1 sont liés à l'actine et la stabilisent. La contraction des muscles lisses est initiée par la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le Reticulum endoplasmique (352, 355). Le  $\text{Ca}^{2+}$  vient de lier à la calmoduline et l'active (352, 355). La calmoduline vient ensuite se lier à CALD1, ce qui cause sa libération des filaments d'actine, exposant les sites de liaison de la myosine sur ces derniers (352, 355). Les têtes motrices de la myosine sont phosphorylées par MYLK (myosin light chain kinase) et interagissent avec l'actine, ce qui permet la contraction (352, 355). L'augmentation de l'expression de TPM1 et de CALD1 pourrait favoriser la formation de complexes TPM1-CALD1, séquestrant ainsi l'actine et empêchant la contraction. La surexpression de TAGLN pourrait être une tentative pour compenser ce problème de contraction en passant par un mécanisme de contraction différent.

## **5.4 – Histologie gastro-intestinale des patients CAID**

Puisque des études antérieures dans notre laboratoire ont validé l'expression de SGO1 dans les muscles lisses, le SNE et les CICs dans les tissus normaux et ont permis d'identifier des anomalies caractéristiques du SNE chez les patients CAID, dans la thèse présente, nous nous sommes plutôt concentrés sur la validation de l'expression des candidats clés identifiés lors des expériences omiques. Nous avons pu valider la surexpression de SGO1 et de BUB1 au niveau de la muscularis externa et des villis. Ces résultats suggèrent que SGO1 et BUB1 jouent un rôle dans le phénotype gastro-intestinal des patients CAID, mais des études supplémentaires sont

requis pour déterminer quels pourraient être ces rôles. Nous avons également confirmé la surexpression de TAGLN dans la muscularis externa et la muscularis mucosa, qui est constituée des couches de muscles lisses circulaires et longitudinaux, soit les principaux muscles impliqués dans le tractus gastro-intestinal, ce qui vient supporter le mécanisme compensatoire postulé de TAGLN dans la contraction des muscles lisses intestinaux à la section 5.3.

## **5.5 – Électrophysiologie des canaux potassiques dans les fibroblastes CAID**

Tel que mentionné précédemment, à la section 5.2, la conduction cardiaque a été mise en évidence comme mécanisme potentiellement impliqué dans le syndrome CAID. Nous avons conséquemment regardé plus en détails l'expression des ARNm qui y sont liés et avons découvert que plusieurs canaux potassiques sont sous-régulés dans le syndrome CAID. Nous avons donc entrepris des études d'électrophysiologie sur les fibroblastes de peau des patients CAID. Ces études ont démontré que le courant  $IK_1$  ainsi que le potentiel de membrane au repos (RMP) sont significativement réduits chez les patients CAID par rapport aux contrôles, ce qui concorde avec la sous-régulation de KCNJ2. Puisque le courant  $IK_1$  est essentiel à l'établissement du potentiel de membrane au repos nécessaire au contrôle de l'excitabilité d'une grande variété de cellules, la diminution importante de ce dernier pourrait être responsable d'anomalies fonctionnelles au niveau des fibroblastes, mais aussi au niveau des cellules cardiaques et intestinales (356, 357).

Une étude effectuée chez le cochon d'Inde a montré que la suppression spécifique de KCNJ2 peut provoquer une activité stimulatrice dans les myocytes ventriculaires, générant ainsi des foyers ventriculaires spontanés causant une altération du rythme cardiaque (358). Une sous-régulation du courant  $IK_1$  a aussi été observée dans l'insuffisance cardiaque (359). De plus, le phénotype QT long ainsi que les arythmies ventriculaires observées dans le syndrome d'Andersen sont une conséquence directe de la suppression dominante négative de la fonction de KCNJ2 (360, 361). Il est donc possible que la sous-régulation de KCNJ2 ait son rôle à jouer dans l'arythmie cardiaque observée chez les patients CAID bien que le mécanisme en cause reste à déterminer. Au niveau de l'intestin, il a été suggéré que les canaux Kir2 (dont fait partie KCNJ2) jouent un rôle dans la régulation du potentiel de membrane et dans l'excitabilité des

muscles lisses dans le côlon (362). Toutefois, des études récentes chez la souris ont montré que les CICs provenant des muscles du côlon expriment des gènes codant pour les canaux potassiques rectifiants entrants, incluant KCNJ2 et KCNJ8, et qu'une conductance aux propriétés cohérentes avec les canaux Kir2 a été observée dans les CICs mais pas dans les cellules des muscles lisses (363). Or, les CICs font partie d'un réseau complexe, appelé le SIP syncytium, qui est composé également de cellules musculaires lisses (364). Cette étude a également démontré que grâce au découplage électrique entre les cellules, l'expression des canaux Kir2 dans les CICs influence également le potentiel membranaire et l'excitabilité des autres cellules du SIP syncytium (363).

À la lumière de ces résultats, il semble donc possible que la sous-régulation de KCNJ2 chez les patients soit impliquée dans le phénotype de POIC observés. Toutefois, des validations supplémentaires dans un modèle plus approprié que les fibroblastes de peau seront nécessaires pour relier le dysfonctionnement du courant  $IK_1$  à des composants spécifiques de la physiopathologie de CAID ainsi qu'à la mutation de *SGO1*. En effet, aucun lien connu n'existe entre SGO1 ou le complexe de la cohésine et la régulation des canaux potassiques. Toutefois, il est possible que le complexe de la cohésine soit impliqué dans leur régulation transcriptionnelle par l'un ou l'autre des mécanismes décrits précédemment (Chapitre 3) et que la mutation de *SGO1* altère cette régulation.

## **5.6 – Caractérisation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ dans les fibroblastes CAID**

Puisque la voie TGF- $\beta$  est connue comme étant impliquée dans les arythmies, la cardiomyopathie et les maladies valvulaires, notre laboratoire a précédemment étudié la réponse des fibroblastes de peau des patients CAID suite à la stimulation de cette voie par le ligand TGF- $\beta$ . (1, 365, 366) Ces études avaient mis en évidence une surrégulation de la voie TGF- $\beta$  basale ainsi que suite à la stimulation par TGF- $\beta$  et ce, via la mesure de la phosphorylation de SMAD2/3, des effecteurs en aval (1). Toutefois, la phosphorylation de SMAD2/3 ne permet pas de prendre en considération toute l'étendue de la réponse suite à la stimulation par TGF- $\beta$  puisque ces effecteurs font partie de la voie canonique seulement. C'est pourquoi nous avons conduit une seconde étude tenant compte à la fois de la voie canonique (pSMAD2/3) et de la

voie non canonique (p38, pERK1/2 et pJNK1/2/3) au cours de laquelle nous avons démontré que la mutation *SGO1* K23E découple les voies de signalisations TGF- $\beta$  canonique et non canonique. Seule la voie canonique est augmentée dans les fibroblastes de patients CAID (à passage précoce (p8) et à passage tardif (p14) avec un effet plus prononcé à passage tardif alors qu'aucun effet notable n'est observé pour la voie non canonique ce qui n'est pas le cas chez les fibroblastes contrôles, où une augmentation simultanée des deux voies a été observée à passage tardif (p14). Ce découplage surprenant des deux voies de signalisation TGF- $\beta$  suggère que la mutation *SGO1* K23E favorise la voie canonique au détriment de la voie non canonique par un mécanisme inconnu. Une hypothèse mécanistique plausible serait que la favorisation de la voie canonique dépende de l'interaction spécifique de SGO1 avec BUB1. En effet, un nouveau rôle non canonique de BUB1 dans l'activation de la voie la signalisation TGF- $\beta$  canonique et non canonique via le recrutement des récepteurs TGFBR1 au niveau du cytoplasme a récemment été découvert, rendant ainsi la surrégulation de BUB1 identifiée par notre étude d'autant plus intéressante (334). Il est possible que la suractivation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  canonique observée résulte en fait de la surexpression de BUB1 bien que le mécanisme reste à définir. Un mécanisme possible pourrait reposer sur le recrutement de SGO1 par BUB1. Puisque BUB1 est requis pour le recrutement centromérique de SGO1, il est fort probable qu'au niveau du cytoplasme, BUB1 soit également capable de recruter SGO1 au niveau des récepteurs TGF- $\beta$  et que cette interaction joue un rôle dans la favorisation de la voie canonique. Le rôle de SGO1 dans ce mécanisme reste à définir, mais il semble plausible que l'interaction SGO1/BUB1 cause la séquestration de BUB1, résultant en l'activation de la voie canonique seulement. Cette hypothèse est renforcée par la surexpression et le schéma de localisation similaire de SGO1 et BUB1 dans les villosités et la *muscularis externa* ainsi que par la fibrose marquée, caractéristique d'une suractivation de la voie TGF- $\beta$ , observée chez les intestins de patients CAID.

Par ailleurs, la surrégulation de l'ARNm de *DUSP2*, une phosphatase qui déphosphoryle ERK1/2, p38, chez les fibroblastes de patients CAID pourraient également jouer un rôle dans le découplage observé des voies canonique et non canonique (367). Il est plausible qu'en fait, les deux voies soient activées par BUB1 ou par l'interaction SGO1/BUB1 et que la voie non canonique soit par la suite réprimée par la surexpression de *DUSP2*. Sur un autre ordre d'idée,

l'expression de TPM1 et de TPM2 et sous le contrôle de la voie de signalisation TGF- $\beta$  (355). Il en va de même pour l'expression de TAGLN qui est sous le contrôle de la voie de signalisation TGF- $\beta$  canonique (353). La voie de signalisation TGF- $\beta$  augmente aussi la force contractile des muscles lisses et le remodelage tissulaire (355). Il est donc possible que la suractivation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  canonique joue un rôle dans le mécanisme compensatoire de la contraction des muscles lisses dépendant de TAGLN de selon l'hypothèse exposée précédemment à la section 5.3.

Tous ces résultats suggèrent que la signalisation canonique TGF- $\beta$  constitue une cascade clé impliquée dans les manifestations cliniques du syndrome CAID. Il s'agit également de la première identification clinique d'un lien entre les cascades TGF- $\beta$  et le complexe de la cohésine.

## **5.7 – Caractérisation de l'épigénome du syndrome CAID**

Les expériences de transcriptomiques décrites précédemment ont soulevé l'hypothèse que le syndrome CAID est un trouble de la dérégulation transcriptionnelle. Or, la régulation transcriptionnelle dépend également de la structure de la chromatine et des modifications épigénétiques. Tel que décrit précédemment, il a été démontré que des composants du complexe de la cohésine, incluant RAD21, SMC1A et d'autres partenaires d'interaction de SGO1, jouent un rôle important dans la régulation transcriptionnelle, et ce via divers mécanismes qui incluent le remodelage de la chromatine (368-371). Par conséquent, il semble plausible qu'un rôle non canonique de SGO1, direct ou indirect, dans le remodelage de la chromatine ou la régulation des marques épigénétique, existe. Étonnamment, nous avons trouvé des différences énormes dans le statut de la méthylation des patients CAID qui présentent une hyperméthylation globale du génome par rapport aux contrôles, et ce, pour les deux passages étudiés. 95,7% et 93,5% des régions différentiellement méthylées étaient hyperméthylées chez les patients CAID à passage précoce (p8) et tardif (p14), respectivement. De plus, les patients CAID présentent une méthylation significativement plus élevée (de 5 à 15% selon le CpG étudié) des rétrotransposons de *LINE-1*, qui constituent environ 17% du génome humain (372).

Bien que la méthylation de l'ADN soit généralement associée à la répression génique, cette corrélation n'a pas été trouvée dans notre étude (Annexe 4). Toutefois, des études récentes

ont montré que la méthylation de l'ADN dans le corps génique peut augmenter l'activité transcriptionnelle en bloquant l'initiation des promoteurs intragéniques au sein de l'unité transcriptionnelle (373-375). En effet, la méthylation de l'ADN pourrait bien être un mécanisme pour contrôler l'utilisation de promoteurs alternatifs (375). La plupart des gènes ont au moins deux sites de départ de la transcription, de sorte que les sites de départ en aval se trouvent dans les «corps» des unités de transcription des promoteurs en amont, ce qui peut grandement compliquer l'interprétation des résultats de méthylation et leur explication en fonction des profils d'expression (376). La méthylation d'un promoteur en aval ne bloque que la transcription de ce promoteur et permet de ce fait l'élongation d'un transcrit à partir d'un promoteur en amont dans l'unité transcriptionnelle (377). Ce cas de figure causerait une contradiction entre les résultats de méthylation et d'expression (377).

Nous avons également observé un patron de fermeture de la chromatine à passage précoce (p8) qui s'accroît à passage tardif (p14). L'analyse plus poussée des marques d'acétylation et de méthylation des histones dans les fibroblastes de patients CAID est en concordance avec le patron de fermeture observé (Annexe 5). Bien qu'aucune différence significative n'ait été obtenue au niveau des marques d'acétylation. Toutefois, une augmentation significative de la méthylation de H3K9me3 ainsi que de la légère augmentation de la méthylation de H3K27me3, soit les principales marques associées à la compaction de la chromatine, a aussi été observée chez les patients CAID (378, 379).

Tout comme pour la méthylation de l'ADN, la compaction de la chromatine est généralement associée à la répression génique. Toutefois, dans son cas, une corrélation acceptable a été trouvée avec les résultats des analyses de transcriptomique (Annexe 4). Il faut toutefois être très prudent avec l'interprétation de ces corrélations. Il est important de garder en tête qu'il y a beaucoup de cas où certains gènes sont différenciellement régulés, mais où l'accessibilité de la chromatine n'est pas différente ou vice-versa. Il en va de même pour les corrélations associées au patron de méthylation. Il faut aussi considérer que ces différentes techniques couvrent des parties différentes du génome et qu'il est très difficile d'étudier la corrélation, car dans plusieurs cas, une région couverte par une analyse ne l'est pas dans l'autre. Néanmoins, les analyses de transcriptomique et d'épigénomique ont montré une convergence au niveau des analyses d'ontologie génétique. Tous ces résultats suggèrent que la régulation



épigénétique, plus précisément l'hyperméthylation et la compaction de la chromatine, joue un rôle clé dans le pathomécanisme du syndrome CAID.

L'implication des modifications épigénétiques dans le pathomécanisme des maladies humaines commence de plus en plus à émerger et constitue une avenue prometteuse puisque de nombreux médicaments ciblant des modifications épigénétiques spécifiques sont déjà approuvés ou en cours de développement.

## **5.8 – Le syndrome CAID dans le spectre des dysrythmies cardiaque et gastro-intestinale**

Maintenant, comment ces découvertes s'alignent-elles avec les phénotypes de dysrythmies cardiaque et gastro-intestinale retrouvés dans le syndrome CAID? Bien que tout ceci soit spéculatif et n'ait pas encore été démontré dans un modèle adéquat, il semble plausible que la mutation *SGO1* K23E ait un impact sur le développement du nœud sinusal et des intestins. Une hypothèse possible serait que SGO1 protège les fonctions stimulatrices en maintenant une expansion appropriée des précurseurs du nœud sinusal et des CICs pendant l'embryogenèse et que la mutation K23E perturbe cet équilibre.

Cette hypothèse est appuyée, au niveau du cœur, par l'identification d'une surrégulation de *BIRC5*, un gène anti-apoptotique qui lie SGO1 en N-terminal (280). *BIRC5* est impliqué dans le contrôle du nombre total de cardiomyocytes et son inhibition spécifique cause des arythmies, y inclut le dysfonctionnement du nœud sinusal (380, 381). Il est concevable que la surexpression du *BIRC5*, tout comme sa sous-expression, cause un déséquilibre au niveau du nombre de cardiomyocytes et résulte en un phénotype pathologique. SGO1 pourrait jouer un rôle direct dans ce mécanisme via son interaction avec *BIRC5*. Puisque le site d'interaction *BIRC5* sur SGO1 est proche de la mutation K23E (Figure 30), il est probable que cette dernière altère la liaison de *BIRC5* à SGO1 et soit responsable du déséquilibre du nombre de cardiomyocytes. La surexpression subséquente de *BIRC5* serait donc une tentative compensatoire. L'analyse par ontologie génétique de nos expériences omiques supporte également l'effet possible de la mutation K23E sur le développement cardiaque et gastro-intestinal.

Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de BIRC5 a été associée au vieillissement dans les fibroblastes de peau humaine (382). Un phénotype similaire a été observé chez les patients CAID qui présentent un taux de sénescence plus élevé (1). Par conséquent, une autre hypothèse possible pourrait être que le vieillissement prématuré et la fibrose, au niveau des cellules du nœud sinusal et des CICs ou de leurs précurseurs, soient impliqués dans le syndrome CAID. En effet, à la naissance, le rythme sinusal et la motilité gastro-intestinale sont normaux chez les patients CAID. Il semble donc que la formation initiale du réseau du nœud sinusal et du réseau des CICs soit suffisante pour maintenir leurs fonctions. En effet, il a été démontré qu'une réduction importante de la taille du nœud sinusal est cliniquement tolérée et n'engendre pas de perte du rythme sinusal (383, 384). Toutefois, les patients CAID reproduisent toutes les caractéristiques du syndrome de bradycardie-tachycardie, une affection que l'on retrouve généralement chez les personnes âgées, ce qui suggère que les processus conduisant à ce phénotype pourraient être accélérés chez ces patients. Ce vieillissement prématuré pourrait également expliquer, en partie, la fibrose observée au niveau des intestins des patients CAID. Cependant, aucun chevauchement phénotypique avec le syndrome de progéria n'a été observé chez les patients CAID et le fait que la mutation K23E n'affecte qu'un sous-ensemble très spécifique des cellules du corps reste un mystère.

Enfin, il est possible que SGO1 ait des effets directs sur la régulation transcriptionnelle de gènes cibles essentiels aux propriétés stimulatrices du réseau du nœud sinusal et du réseau des CICs. L'analyse par ontologie génétique de nos études omiques a mis en évidence l'implication possible de la contraction des muscles lisses et cardiaques ainsi que la conduction dans le pathomécanisme du syndrome CAID. Il est donc concevable que SGO1 contribue à maintenir un patron d'expression spécifique des cellules spécialisées, après la naissance, afin d'assurer ces fonctions. Toutefois, les mécanismes impliqués restent encore non identifiés.

Afin de valider ces hypothèses, nous avons déployé des efforts considérables au cours des dernières années afin de générer un meilleur modèle d'étude, soit un modèle murin du syndrome CAID.

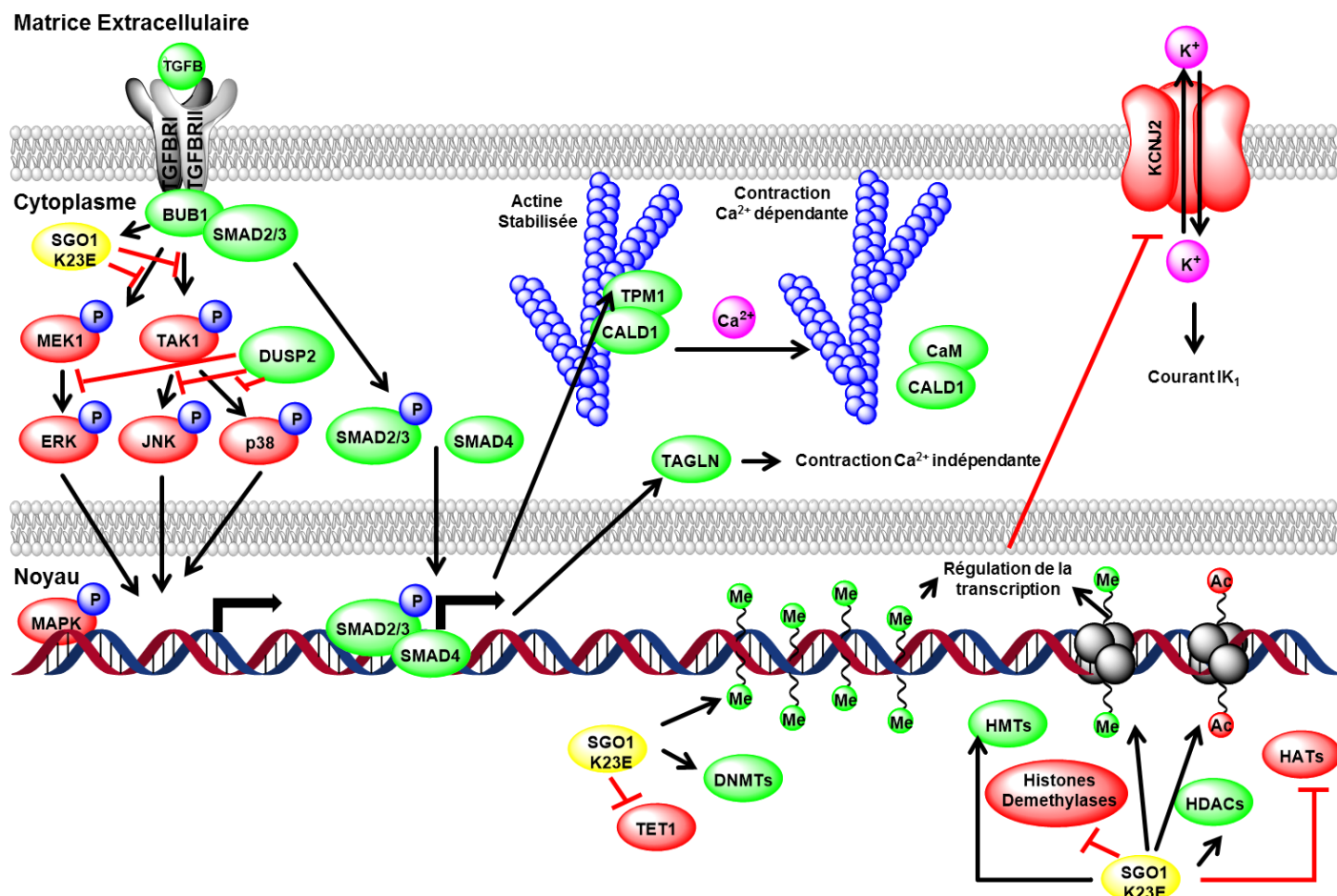
## 5.9 – Génération des modèles murins du syndrome CAID

Puisque le syndrome CAID est un syndrome humain, certaines limitations en termes de disponibilité du matériel biologique ont été rencontrées au cours de cette étude. Bien évidemment, l'accès à des cellules/biopsies cardiaques et intestinales étant impossible ou limité, nous avons tenté de nous rabattre sur un modèle plus facile d'accès et plus conventionnel, le modèle murin. Toutefois, la létalité embryonnaire précoce associée à la plupart des knockouts des composants de la cohésine a rendu impossible la réplique précise de CAID chez la souris, ne laissant que les fibroblastes de peau et les biopsies intestinales des patients CAID pour l'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans ce syndrome, bien que nous soyons conscients qu'il ne s'agit pas du modèle idéal. Plusieurs tentatives de génération de modèles murins ont été faites dans notre laboratoire afin de caractériser l'implication de *SGOI* dans les cascades moléculaires régulant différents types cellulaires et stades développementaux critiques pour la bonne formation du cœur et de l'intestin, avec un accent particulier sur les sous-types respectifs de cellules stimulatrices. Pour phénotyper le syndrome CAID chez des souris postnatales et adultes, nous avons utilisé deux stratégies, soit la génération d'un modèle murin mutant homozygote ubiquitaire *Sgo1* K23E/K23E et l'élimination conditionnelle de *Sgo1* d'une manière dépendante du stade et du type cellulaire avec la technologie Cre/lox. Pour le premier modèle (*Sgo1* K23E/K23E ubiquitaire), nous avons généré une lignée portant la même mutation (*Sgol1* K23E) que celle retrouvée chez les patients CAID. Le croisement de souris hétérozygotes *Sgol1* K23E/wt afin de générer des mutants homozygotes dans un fond génétique 129SvJ a révélé que la mutation homozygote *Sgo1* K23E/K23E est embryonnaire létale au cours de la première semaine suivant la conception (c'est-à-dire, avant E8). Ceci est en contradiction avec la progression du syndrome qui est postnatale chez les patients CAID. Puisque la sévérité des phénotypes murins résulte parfois du fond génétique, nous avons rétrocroisé la souris hétérozygote *Sgo1* K23E/wt dans un fond génétique C57Bl/6NJ et testé si la survie était améliorée. En effet, la survie des mutants *Sgo1* K23E/K23E a été légèrement améliorée dans un fond génétique plus de 99% C57Bl/6NJ (c'est-à-dire rétrocroisé 5-10 fois). Cependant, les embryons mutants homozygotes à E9 et E10 étaient plus petits que les contrôles de type sauvage provenant de la même litière et aucun mutant n'a été observé après la naissance. Puisqu'il a été rapporté que d'autres modèles de souris mutantes pour des composants du complexe de la

cohésine survivent postnatalement dans un fond génétique CAST/EiJ (Christoph Preuss, Jackson Laboratory, communication personnelle), nous avons rétrocroisé les souris *Sgo1* K23E/wt d'un fond C57Bl/6NJ à un fond CAST/EiJ et analysé la survie et les phénotypes à chaque fond consécutif, soit de 50-50%, à 25-75%, 12,5-87,5%, 6,25-93,75%, 3-97% C57-CAST, etc. Nous avons observé la survie postnatale des mutants homozygotes lorsqu'ils étaient sur un fond de 75% ou plus CAST, avec environ la moitié du nombre attendu de mutants survivants. Ce taux de survie n'a pas changé de façon substantielle avec des rétrocroisements supplémentaires. Des analyses supplémentaires faites sur les embryons mutants à E10 et E14 a indiqué que, bien que ~ 50% des souris *Sgo1* K23E/K23E sur un fond CAST / EiJ survivent, les 50% restants meurent toujours avant E10. L'analyse morphologique, anatomique et fonctionnelle des mutants survivants après la naissance n'a révélé aucun défaut majeur dans la fonction cardiaque ou intestinale. Tout ceci suggère que bien que la survie des mutants *Sgo1* ait été améliorée sur un fond CAST, la pénétrance phénotypique a également diminué. Pour le deuxième modèle, nous avons utilisé à la fois des lignées Cre constitutive et inducible au tamoxifène pour supprimer l'expression du gène *Sgo1* dans des cellules et des tissus spécifiques. Nous avons observé que la suppression embryonnaire de *Sgo1* dans les lignées mésodermiques, de la crête neurale et du deuxième champ cardiaque (qui jouent tous un rôle dans le développement du nœud sinusal comme décrit au Chapitre 1.1.3) a entraîné une létalité embryonnaire autour de E9-E10. La suppression postnatale de *Sgo1* dans les lignées Cre inducibles au tamoxifène spécifiques pour le cœur et le stimulateur cardiaque n'a donné aucun phénotype détectable. Dans l'ensemble, ceci suggère que *Sgo1* est d'une importance cruciale pour le développement embryonnaire précoce de la souris, puisque sa mutation ou sa suppression provoque la létalité embryonnaire et qu'un rôle autonome non létal pour *Sgo1* dans les cellules cardiaques et/ou stimulatrices cardiaques est probablement présent pendant la gestation tardive. Des expériences sont en cours pour tester la nécessité embryonnaire tardive/fœtale de *Sgo1* dans le développement des cellules stimulatrices.

## 5.10 – Intégration et modèle mécanistique du syndrome CAID

L'intégration de toutes ces découvertes nous a permis de générer un modèle mécanistique qui récapitule les effets de la mutation K23E dans le syndrome CAID (Figure 42).



**Figure 38. Mécanisme proposé des effets de la mutation SGO1 K23E dans le syndrome CAID.**

Au niveau du cytoplasme, la protéine SGO1 K23E délocalisée joue un nouveau rôle dans la régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  en favorisant la voie canonique au détriment de la voie non canonique, vraisemblablement via le recrutement de SGO1 par BUB1 au niveau des récepteurs TGFBRs et de la séquestration de BUB1 au niveau de la voie canonique. Il est également possible que l'inhibition de la voie non canonique passe par la surexpression de DUPS2 qui déphosphoryle ERK, JNK et p38. L'augmentation chronique de la voie de signalisation TGF- $\beta$  canonique cause une fibrose caractéristique dans les tissus intestinaux, des

défauts de contraction, et possiblement des défauts au niveau de l'auto-inhibition de la voie. L'augmentation de la voie de signalisation canonique de TGF- $\beta$  cause possiblement l'augmentation de l'expression de TPM1. Cette surexpression favorise la stabilisation du cytosquelette d'actine au détriment des contractions dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'augmentation de la voie de signalisation canonique de TGF- $\beta$  cause également une surexpression de TAGLN afin de favoriser la contraction des muscles indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  pour compenser pour la perturbation de la contraction due à la fibrose des muscles lisses et à la stabilisation du cytosquelette d'actine.

Au niveau du noyau, la protéine SGO1 K23E régule possiblement la transcription en modifiant la régulation épigénétique. La mutation *SGO1* K23E cause une augmentation de la méthylation de l'ADN au niveau du génome, de manière directe ou indirecte, soit par activation des DNMTs ou par inhibition de TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1) via un mécanisme qui ne dépend pas de leur expression différentielle, mais plutôt de la régulation des voies de signalisation impliquées. La mutation *SGO1* K23E favorise également la fermeture globale de la chromatine, possiblement via l'augmentation de la méthylation au niveau des histones H3K9 et H3K27, de manière directe ou indirecte, par activation des HMTs et/ou des HDACs, ou par inhibition des HATs et/ou des histones déméthylases via un mécanisme semblable à celui impliqué dans la méthylation globale. Finalement, la mutation *SGO1* K23E régule à la baisse l'expression de *KCNJ2*, de manière directe ou indirecte, causant ainsi un dysfonctionnement du courant  $\text{IK}_1$  possiblement impliqué dans l'arythmie généralisée observée.

## 5.11 – Limitations

Certaines limitations ont été rencontrées lors de cette étude. Pour nos analyses, nous avons utilisé au départ des fibroblastes de peau provenant de 3 patients CAID et de 4 contrôles de type sauvage (3 d'origine Caucasienne achetées auprès de la compagnie ATCC et 1 d'origine Canadienne-Française, incluant des fibroblastes néonataux et adultes). L'analyse des résultats de RNAseq a montré un impact énorme de l'âge (néonataux vs adultes) et de l'ethnicité (Caucasienne vs Canadienne-Française). Les analyses ont donc été refaites avec 6 échantillons de patients CAID et 6 de contrôles de type sauvage d'origine canadienne-française puisque les patients CAID sont eux aussi Canadiens-Français. Toutefois, après considération du génotype,

du passage, du sexe et de l'âge des biopsies, 3 biopsies ont été exclues des analyses pour chacun des génotypes dus à de possibles effets de l'âge sur les résultats.

La caractérisation du protéome des patients CAID a également été difficile. Tout d'abord, l'expérience de SILAC a dû être conduite deux fois dû à l'incapacité des lignées homozygotes à incorporer les isotopes lourds. Le design a dû être inversé et les cellules cultivées à nouveau. Ensuite, le même problème que lors des analyses de RNAseq est survenu lors des analyses de SILAC où les résultats du patient CAID jumelé aux fibroblastes néonataux étaient nettement différents de ceux jumelés à des contrôles adultes. De plus, étant donné que la plage dynamique du SILAC pour l'identification et la quantification des protéines chez l'homme peut varier entre 1 000 et 5 000, le protéome complet n'est pas couvert (385). En effet, le SILAC ne peut pas détecter les protéines faiblement exprimées, comme c'était le cas de plusieurs gènes candidats identifiés par RNAseq. Le design du SILAC effectue aussi une comparaison unique entre un contrôle et un patient CAID sans possibilité de comparaison entre les différents échantillons, donnant lieu à beaucoup de variations entre les duos. Il aurait été préférable de procéder au SILAC en triplicatas au lieu de constituer 3 duos avec des patients CAID et des contrôles différents. L'utilisation de 3 patients CAID et d'un seul contrôle pour les 3 aurait également été une meilleure option.

Pour ce qui est du RRBS, bien que cette technique offre une large couverture (environ 1,5 millions de CpG), il ne s'agit que d'une représentation partielle des 28 millions de CpG présents dans le génome (386, 387). En effet, seulement une partie des régions régulant l'expression des gènes (promoteurs et «enhancers») est interrogée. Afin de surmonter cet obstacle, le «Whole-Genome Bisulfite Sequencing» aurait pu être utilisé pour couvrir l'intégralité du génome, mais cette technique est beaucoup plus dispendieuse et difficile à analyser. De nouvelles méthodes couvrant une plus grande partie du génome et de manière moins aléatoire ont également faites leur apparition. C'est le cas du Methyl-seq qui couvre environ 3,7 millions de CpG situés au niveau des promoteurs, des îlots CpG, et de 400 bp de chaque côté des îlots CpG (388, 389). En effet, des études ont montré que de nombreuses altérations de la méthylation se trouvent non pas dans les promoteurs ou les CpG, mais plutôt dans les 2 kb autour des CpG (390-392). L'utilisation d'une de ces méthodes aurait pu permettre

une meilleure couverture et par conséquent, un meilleur chevauchement des différentes régions analysées par les différentes techniques.

L'ATAC-seq, quant à lui, a dû être répété 3 fois avant d'obtenir des résultats concluants. La première fois, le nombre de duplicatas PCR était trop élevé dû à la difficulté de lyser les cellules et à libérer l'ADN. La deuxième fois, le double de cellules ainsi que le double d'enzyme Tn5 ont été utilisés afin d'extraire et de fragmenter une quantité d'ADN plus importante pour éviter le problème des duplicatas PCR, mais sans succès. La troisième fois, un protocole de lyse différent utilisant 2 tampons de lyse au lieu d'un seul a été utilisé avec succès.

Finalement, tel que discuté précédemment, les fibroblastes de peau n'étaient pas le modèle idéal. Toutefois, au moment de l'étude, ces derniers ainsi que les biopsies intestinales de patients CAID étaient les seuls modèles disponibles pour étudier les mécanismes impliqués dans le syndrome CAID.

## **5.12 – Perspectives**

Au cours des dernières années, il est devenu de plus en plus évident qu'aucune technologie ne peut à elle seule expliquer toute la complexité des événements moléculaires impliqués dans les maladies humaines. L'intégration de plusieurs technologies omiques est donc devenue une approche utile afin de fournir une vision plus complète de la biologie et des maladies (393). Comme c'est le cas dans le syndrome CAID, il arrive que le rôle du variant identifié dans la pathologie ne soit pas évident à première vue, d'autant plus si le gène en question n'est pas bien décrit (393). De ce fait, l'intégration de plusieurs technologies omiques peut être utilisée pour l'identification d'événements moléculaires pouvant expliquer le phénotype observé ou pour fournir des preuves supplémentaires que la mutation candidate est causale (393). Cette approche a été couronnée de succès dans certaines études portant sur des maladies mendéliennes rares, soit la mitochondriopathie et la dystrophie musculaire (394, 395). Le séquençage de l'ARN provenant de tissus de patients a permis d'établir un diagnostic moléculaire pour de nombreux patients, en identifiant des gènes présentant une expression aberrante, un épissage ou une expression spécifique à un allèle, suggérant ainsi un mécanisme moléculaire pour la progression de la maladie (394, 395). Les candidats ont ensuite été validés par études protéomiques (394, 395). Nous n'en sommes pas encore là avec le syndrome CAID,



mais l'intégration des expériences omiques nous a permis d'identifier des voies de signalisation d'intérêt pour expliquer le pathomécanisme.

Des études futures seront nécessaires afin de valider, dans des modèles plus appropriés, les différents mécanismes potentiellement impliqués dans la pathophysiologie du syndrome CAID découverts lors de cette thèse. En plus d'un modèle de souris pour le syndrome CAID, notre laboratoire travaille également sur la génération de cellules fonctionnelles du nœud sinusal ainsi que sur un modèle d'organoïde intestinal (tissus multicellulaires tridimensionnels qui imitent les aspects de l'intestin *in vivo*) à partir de cellules ips de patients CAID (elles-mêmes générées à partir des fibroblastes de peau des patients). Les organoïdes sont générés par différenciation dirigée en mimant les voies de signalisation et l'environnement requis pour le développement intestinal (396). Ils sont constitués d'une lumière épithéliale, de couches mésenchymateuses et de cellules du SNE (comprenant différents types de cellules neuronales) (397, 398). Lorsque ces organoïdes sont transplantés chez des souris immunodéficientes et poursuivent leur maturation, ils commencent à ressembler à leurs homologues *in vivo* et présentent une amélioration de la fonctionnalité musculaire et neuronale ainsi que des mouvements de type péristaltique (398). Il s'agit donc d'un modèle de choix pour étudier le phénotype de POIC retrouvé dans le syndrome CAID et comment la mutation *SGOI* K23E affecte l'intestin au cours du développement et après le développement. Les organoïdes permettront également d'étudier si le phénotype POIC du syndrome CAID provient d'un dysfonctionnement d'un type cellulaire en particulier (cellules du SNE ou musculaires lisses, cellules stromales, CICs ou épithéliales). En effet, l'analyse d'une seule cellule sur plateforme 10x Genomics Chromium permettra d'obtenir des informations cellulaires spécifiques qui permettront de dresser un portrait détaillé des types cellulaires affectés par la mutation *SGOI* K23E et qui ne pourrait être obtenues par séquençage de l'ARN traditionnel du à l'hétérogénéité des organoïdes. Cette approche pourra également être appliquée aux modèles murins au niveau du cœur et des intestins. Nous sommes également en train de générer des modèles cellulaires (normaux et avec la mutation *SGOI* K23E) pour les différentes isoformes de *SGO1* afin de déterminer si le syndrome CAID est dépendant d'une isoformes en particulier.

## 5.13 – Conclusion

En conclusion, les études de criblage omiques nous ont permis d'établir pour la première fois la signature moléculaire du syndrome CAID, et ce, à tous les niveaux du dogme de la biologie moléculaire (ADN, ARN et protéines). Ces études ont confirmé l'hypothèse selon laquelle se sont des fonctions non canoniques de SGO1 qui sont responsables de la pathologie associée et non la perturbation du cycle cellulaire. Ces études ont également permis de constater que le syndrome CAID ne résulte pas du dysfonctionnement d'une voie de signalisation unique, comme ce fut longtemps pensé dans le cadre des maladies mendéliennes autosomales récessives, mais plutôt de l'effet cumulatif du dysfonctionnement de plusieurs voies de signalisation. Nous avons identifié la dysrégulation de la signalisation canonique TGF- $\beta$ , l'hyperméthylation de l'ADN, la compaction de la chromatine et la diminution du courant  $IK_1$  comme étant impliqués dans les manifestations cliniques du syndrome CAID. De plus, la comparaison du syndrome CAID avec les autres cohésinopathies a permis de faire la lumière sur les pathomécanismes possibles impliqués dans ces syndromes et les rôles potentiels de SGO1 dans le développement et le fonctionnement du nœud sinusal et des intestins. La dérégulation de voies pouvant être ciblées par des médicaments, telles que la cascade de TGF- $\beta$  et les modifications épigénétiques, constitue une cible de choix pour le développement de traitements médicaux pour le syndrome CAID, mais également pour l'étude d'autres affections cardiaques et gastro-intestinales telles que la MNS, la POIC et le syndrome du côlon irritable (qui présente des symptômes très similaires à la POIC, mais dont la sévérité est moindre) et qui affectent des patients du monde entier (399, 400).

## Bibliographie

1. Chetaille P, Preuss C, Burkhard S, Cote JM, Houde C, Castilloux J, et al. Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. 2014;46(11):1245-9.
2. Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology : a cellular and molecular approach. 2nd<sup>e</sup> éd. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.
3. Campbell NA, Reece JB. Biology. 7th<sup>e</sup> éd. San Francisco: Pearson, Benjamin Cummings; 2005.
4. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. Nature reviews Molecular cell biology. 2013;14(8):529-41. Epub 2013/07/11.
5. Stankunas K, Hang CT, Tsun ZY, Chen H, Lee NV, Wu JI, et al. Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. Developmental cell. 2008;14(2):298-311. Epub 2008/02/13.
6. Mikawa T, Hurtado R. Development of the cardiac conduction system. Seminars in cell & developmental biology. 2007;18(1):90-100. Epub 2007/02/10.
7. Mikawa T, Gourdie RG, Takebayashi-Suzuki K, Kanzawa N, Hyer J, Pennisi DJ, et al. Induction and patterning of the Purkinje fibre network. Novartis Foundation symposium. 2003;250:142-53; discussion 53-6, 276-9. Epub 2003/09/06.
8. Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. Experimental biology and medicine (Maywood, NJ). 2007;232(7):866-80. Epub 2007/07/05.
9. Combs MD, Yutzey KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. Circulation research. 2009;105(5):408-21. Epub 2009/08/29.
10. Braunwald E. Structure and function of the normal myocardium. British heart journal. 1971;33:Suppl:3-8. Epub 1971/01/01.
11. Dubiel JP. [Function and importance of the pericardium]. Folia medica Cracoviensia. 1991;32(1-2):5-14. Epub 1991/01/01. Czynosc i znaczenie osierdzia.
12. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nature reviews Genetics. 2005;6(11):826-35. Epub 2005/11/24.
13. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. Science (New York, NY). 2006;313(5795):1922-7. Epub 2006/09/30.
14. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. Cell. 2006;126(6):1037-48. Epub 2006/09/23.
15. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2013;3(10):a013847. Epub 2013/10/03.
16. Sturzu AC, Wu SM. Developmental and regenerative biology of multipotent cardiovascular progenitor cells. Circulation research. 2011;108(3):353-64. Epub 2011/02/05.
17. Kimelman D. Mesoderm induction: from caps to chips. Nature reviews Genetics. 2006;7(5):360-72. Epub 2006/04/19.
18. Nosedá M, Peterkin T, Simoes FC, Patient R, Schneider MD. Cardiopoietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment. Circulation research. 2011;108(1):129-52. Epub 2011/01/08.

19. Showell C, Binder O, Conlon FL. T-box genes in early embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2004;229(1):201-18. Epub 2003/12/31.
20. Gessert S, Kuhl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circulation research*. 2010;107(2):186-99. Epub 2010/07/24.
21. Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Developmental cell*. 2006;11(5):723-32. Epub 2006/11/07.
22. Bondue A, Blanpain C. Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation research*. 2010;107(12):1414-27. Epub 2010/12/15.
23. Costello I, Pimeisl IM, Drager S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ. The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nature cell biology*. 2011;13(9):1084-91. Epub 2011/08/09.
24. Lescroart F, Chabab S, Lin X, Rulands S, Paulissen C, Rodolosse A, et al. Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mesp1 progenitors during mammalian heart development. *Nature cell biology*. 2014;16(9):829-40. Epub 2014/08/26.
25. Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(15):3437-47. Epub 1999/07/07.
26. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes & development*. 1997;11(4):451-62. Epub 1997/02/15.
27. Reifers F, Walsh EC, Leger S, Stainier DY, Brand M. Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(2):225-35. Epub 1999/12/22.
28. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & development*. 2001;15(3):316-27. Epub 2001/02/13.
29. Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes & development*. 2001;15(3):304-15. Epub 2001/02/13.
30. Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes & development*. 2001;15(3):255-60. Epub 2001/02/13.
31. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development (Cambridge, England)*. 1993;119(3):969. Epub 1993/11/01.
32. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(4):2235-46. Epub 1993/04/01.
33. Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T. GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development (Cambridge, England)*. 1993;118(3):817-27. Epub 1993/07/01.
34. Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Developmental biology*. 1994;164(2):361-73. Epub 1994/08/01.
35. Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(7):544-56. Epub 2002/07/03.

36. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*. 2001;106(6):709-21. Epub 2001/09/27.
37. Cohen ED, Wang Z, Lepore JJ, Lu MM, Taketo MM, Epstein DJ, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(7):1794-804. Epub 2007/07/04.
38. Kelly RG. The second heart field. *Current topics in developmental biology*. 2012;100:33-65. Epub 2012/03/28.
39. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Current topics in developmental biology*. 2010;90:1-41. Epub 2010/08/10.
40. Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Developmental biology*. 2008;317(2):614-9. Epub 2008/04/11.
41. Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovascular research*. 2011;91(2):212-22. Epub 2011/04/19.
42. Tzahor E. Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter. *Developmental cell*. 2007;13(1):10-3. Epub 2007/07/05.
43. Cohen ED, Tian Y, Morrissey EE. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development (Cambridge, England)*. 2008;135(5):789-98. Epub 2008/02/12.
44. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*. 2006;127(6):1151-65. Epub 2006/11/25.
45. Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien CL, Schultheiss TM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006;127(6):1137-50. Epub 2006/11/25.
46. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*. 2009;460(7251):113-7. Epub 2009/07/03.
47. Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*. 2008;454(7200):104-8. Epub 2008/05/16.
48. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008;454(7200):109-13. Epub 2008/06/24.
49. Zhou B, von Gise A, Ma Q, Rivera-Feliciano J, Pu WT. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;375(3):450-3. Epub 2008/08/30.
50. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental cell*. 2003;5(6):877-89. Epub 2003/12/12.
51. Gilsbach R, Preissl S, Gruning BA, Schnick T, Burger L, Benes V, et al. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nature communications*. 2014;5:5288. Epub 2014/10/23.
52. Gilsbach R, Schwaderer M, Preissl S, Gruning BA, Kranzhofer D, Schneider P, et al. Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart in vivo. *Nature communications*. 2018;9(1):391. Epub 2018/01/28.

53. Hang CT, Yang J, Han P, Cheng HL, Shang C, Ashley E, et al. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature*. 2010;466(7302):62-7. Epub 2010/07/03.
54. Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, et al. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature*. 2004;432(7013):107-12. Epub 2004/11/05.
55. Morey L, Santanach A, Blanco E, Aloia L, Nora EP, Bruneau BG, et al. Polycomb Regulates Mesoderm Cell Fate-Specification in Embryonic Stem Cells through Activation and Repression Mechanisms. *Cell stem cell*. 2015;17(3):300-15. Epub 2015/09/05.
56. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(1):32-42. Epub 2008/12/10.
57. Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(8):4070-5. Epub 2000/03/29.
58. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 2002;110(4):479-88. Epub 2002/08/31.
59. Gusterson RJ, Jazrawi E, Adcock IM, Latchman DS. The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):6838-47. Epub 2002/12/13.
60. Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circulation research*. 2006;98(1):15-24. Epub 2006/01/07.
61. Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, Kawamura T, Wada H, Matsumori A, et al. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(10):3593-606. Epub 2003/05/02.
62. Dai YS, Markham BE. p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(40):37178-85. Epub 2001/08/02.
63. Slepak TI, Webster KA, Zang J, Prentice H, O'Dowd A, Hicks MN, et al. Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor-2D. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):7575-85. Epub 2000/11/30.
64. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Signaling chromatin to make muscle. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(6):763-72. Epub 2002/12/11.
65. Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth LM, Zhang CL, Schreiber K, et al. Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):28930-7. Epub 2003/05/23.
66. Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, Lu MM, Wing-Man Yung W, Mackay J, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(6):863-71. Epub 2003/09/17.
67. Kee HJ, Kook H. Roles and targets of class I and IIa histone deacetylases in cardiac hypertrophy. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:928326. Epub 2010/12/15.
68. Serra-Juhe C, Cusco I, Homs A, Flores R, Toran N, Perez-Jurado LA. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics*. 2015;10(2):167-77. Epub 2015/01/15.

69. Grunert M, Dorn C, Cui H, Dunkel I, Schulz K, Schoenhals S, et al. Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases. *Cardiovascular research*. 2016;112(1):464-77. Epub 2016/08/09.
70. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature genetics*. 1999;23(3):333-7. Epub 1999/11/05.
71. Martinez-Morentin L, Martinez L, Piloto S, Yang H, Schon EA, Garesse R, et al. Cardiac deficiency of single cytochrome oxidase assembly factor scox induces p53-dependent apoptosis in a Drosophila cardiomyopathy model. *Human molecular genetics*. 2015;24(13):3608-22. Epub 2015/03/21.
72. Ai S, Yu X, Li Y, Peng Y, Li C, Yue Y, et al. Divergent Requirements for EZH1 in Heart Development Versus Regeneration. *Circulation research*. 2017;121(2):106-12. Epub 2017/05/18.
73. Park CY, Pierce SA, von Drehle M, Ivey KN, Morgan JA, Blau HM, et al. skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(48):20750-5. Epub 2010/11/13.
74. Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, Sauter N, Roth JF, Marino S, et al. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *The EMBO journal*. 2003;22(19):5175-85. Epub 2003/10/01.
75. Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ, et al. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 2009;460(7252):287-91. Epub 2009/06/02.
76. Van Laarhoven PM, Neitzel LR, Quintana AM, Geiger EA, Zackai EH, Clouthier DE, et al. Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Human molecular genetics*. 2015;24(15):4443-53. Epub 2015/05/15.
77. Hughes HE, Davies SJ. Coarctation of the aorta in Kabuki syndrome. *Archives of disease in childhood*. 1994;70(6):512-4. Epub 1994/06/01.
78. Digilio MC, Marino B, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart defects in Kabuki syndrome. *American journal of medical genetics*. 2001;100(4):269-74. Epub 2001/05/09.
79. Basson MA, van Ravenswaaij-Arts C. Functional Insights into Chromatin Remodelling from Studies on CHARGE Syndrome. *Trends in genetics : TIG*. 2015;31(10):600-11. Epub 2015/09/29.
80. Park DS, Fishman GI. 29 - Cell Biology of the Specialized Cardiac Conduction System. Dans: Zipes DP, Jalife J, rédacteurs. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Sixth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2014. p. 287-96.
81. Keith A, Flack M. The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *Journal of anatomy and physiology*. 1907;41(Pt 3):172-89. Epub 1907/04/01.
82. Anderson KR, Ho SY, Anderson RH. Location and vascular supply of sinus node in human heart. *British heart journal*. 1979;41(1):28-32. Epub 1979/01/01.
83. Opthof T. The mammalian sinoatrial node. *Cardiovascular drugs and therapy*. 1988;1(6):573-97. Epub 1988/03/01.

84. James TN, Sherf L, Fine G, Morales AR. Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. *Circulation*. 1966;34(1):139-63. Epub 1966/07/01.
85. Masson-Pevet M, Bleeker WK, Mackaay AJ, Bouman LN, Houtkooper JM. Sinus node and atrium cells from the rabbit heart: a quantitative electron microscopic description after electrophysiological localization. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1979;11(6):555-68. Epub 1979/06/01.
86. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular research*. 2000;47(4):658-87. Epub 2000/09/07.
87. Verheijck EE, Wessels A, van Ginneken AC, Bourier J, Markman MW, Vermeulen JL, et al. Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. *Circulation*. 1998;97(16):1623-31. Epub 1998/05/21.
88. Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, Kodama I. Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node. *The American journal of physiology*. 1998;275(4):H1158-68. Epub 1998/09/24.
89. Kodama I, Boyett MR, Nikmaram MR, Yamamoto M, Honjo H, Niwa R. Regional differences in effects of E-4031 within the sinoatrial node. *The American journal of physiology*. 1999;276(3):H793-802. Epub 1999/03/10.
90. Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM. Regional differences in the role of the Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 2):H2793-806. Epub 1997/06/01.
91. Nikmaram MR, Boyett MR, Kodama I, Suzuki R, Honjo H. Variation in effects of Cs<sup>+</sup>, UL-FS-49, and ZD-7288 within sinoatrial node. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 2):H2782-92. Epub 1997/06/01.
92. Oei HI, Van Ginneken AC, Jongsma HJ, Bouman LN. Mechanisms of impulse generation in isolated cells from the rabbit sinoatrial node. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1989;21(11):1137-49. Epub 1989/11/01.
93. Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P, et al. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovascular research*. 2004;63(1):77-86. Epub 2004/06/15.
94. Bleeker WK, Mackaay AJ, Masson-Pevet M, Bouman LN, Becker AE. Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circulation research*. 1980;46(1):11-22. Epub 1980/01/01.
95. Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovascular research*. 2007;73(4):729-38. Epub 2007/01/16.
96. Fedorov VV, Schuessler RB, Hemphill M, Ambrosi CM, Chang R, Voloshina AS, et al. Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circulation research*. 2009;104(7):915-23. Epub 2009/02/28.
97. Kreuzberg MM, Willecke K, Bukauskas FF. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends in cardiovascular medicine*. 2006;16(8):266-72. Epub 2006/10/24.
98. Gros D, Theveniau-Ruissy M, Bernard M, Calmels T, Kober F, Sohl G, et al. Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovascular research*. 2010;85(1):45-55. Epub 2009/08/15.



99. Tellez JO, Dobrzynski H, Greener ID, Graham GM, Laing E, Honjo H, et al. Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circulation research*. 2006;99(12):1384-93. Epub 2006/11/04.
100. Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15235-40. Epub 2003/12/06.
101. Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene expression patterns : GEP*. 2003;3(6):777-83. Epub 2003/12/04.
102. Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, de Gier-de Vries C, Wiese C, Clout DE, et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circulation research*. 2007;100(3):354-62. Epub 2007/01/20.
103. Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, et al. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes & development*. 2007;21(9):1098-112. Epub 2007/05/03.
104. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circulation research*. 2010;106(2):240-54. Epub 2010/02/06.
105. Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM. The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE*. 2010;33(11):1392-406. Epub 2010/10/16.
106. Wiese C, Grieskamp T, Airik R, Mommersteeg MT, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circulation research*. 2009;104(3):388-97. Epub 2008/12/20.
107. van Eif VWW, Devalla HD, Boink GJJ, Christoffels VM. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nature reviews Cardiology*. 2018;15(10):617-30. Epub 2018/06/08.
108. Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, de Gier-de Vries C, Soufan AT, et al. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circulation research*. 2006;98(12):1555-63. Epub 2006/05/20.
109. Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, de Gier-de Vries C, Harvey RP, Moorman AF, et al. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circulation research*. 2007;101(9):902-9. Epub 2007/09/08.
110. Espinoza-Lewis RA, Yu L, He F, Liu H, Tang R, Shi J, et al. Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Developmental biology*. 2009;327(2):376-85. Epub 2009/01/27.
111. Espinoza-Lewis RA, Liu H, Sun C, Chen C, Jiao K, Chen Y. Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. *Developmental biology*. 2011;356(2):359-69. Epub 2011/06/07.
112. Ye W, Wang J, Song Y, Yu D, Sun C, Liu C, et al. A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(14):2521-32. Epub 2015/07/04.
113. Mori AD, Zhu Y, Vahora I, Nieman B, Koshiba-Takeuchi K, Davidson L, et al. Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Developmental biology*. 2006;297(2):566-86. Epub 2006/07/28.

114. Puskaric S, Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, Bruneau BG, et al. Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Human molecular genetics*. 2010;19(23):4625-33. Epub 2010/09/23.
115. Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, et al. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation*. 2007;115(14):1830-8. Epub 2007/03/21.
116. Sun Y, Liang X, Najafi N, Cass M, Lin L, Cai CL, et al. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Developmental biology*. 2007;304(1):286-96. Epub 2007/01/30.
117. Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, Stubbendorff M, Hua X, Muller JC, et al. Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circulation research*. 2012;110(10):1303-10. Epub 2012/03/20.
118. Vedantham V, Galang G, Evangelista M, Deo RC, Srivastava D. RNA sequencing of mouse sinoatrial node reveals an upstream regulatory role for Islet-1 in cardiac pacemaker cells. *Circulation research*. 2015;116(5):797-803. Epub 2015/01/28.
119. Liang X, Zhang Q, Cattaneo P, Zhuang S, Gong X, Spann NJ, et al. Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(8):3256-68. Epub 2015/07/21.
120. Hoffmann S, Berger IM, Glaser A, Bacon C, Li L, Gretz N, et al. Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor Shox2 and rescues the Shox2-mediated bradycardia. *Basic research in cardiology*. 2013;108(2):339. Epub 2013/03/05.
121. Frank DU, Carter KL, Thomas KR, Burr RM, Bakker ML, Coetzee WA, et al. Lethal arrhythmias in Tbx3-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(3):E154-63. Epub 2011/12/29.
122. Bakker ML, Boink GJ, Boukens BJ, Verkerk AO, van den Boogaard M, den Haan AD, et al. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovascular research*. 2012;94(3):439-49. Epub 2012/03/16.
123. Wu M, Peng S, Yang J, Tu Z, Cai X, Cai CL, et al. Baf250a orchestrates an epigenetic pathway to repress the Nkx2.5-directed contractile cardiomyocyte program in the sinoatrial node. *Cell research*. 2014;24(10):1201-13. Epub 2014/08/26.
124. Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(1):55-64. Epub 2009/07/14.
125. Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovascular research*. 2006;72(2):271-81. Epub 2006/09/23.
126. Santana LF, Cheng EP, Lederer WJ. How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;49(6):901-3. Epub 2010/09/21.
127. . Paris2007. Petit Larousse de la Médecine; p. 457.
128. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 1981;391(2):85-100. Epub 1981/08/01.
129. Patch me if you can – What is the patch-Clamp Technique? [puzzledponderer.wordpress.com](http://puzzledponderer.wordpress.com) : ; .

130. Benditt DG SS, Goldstein MA, Lurie KG, Gornick CC, Adler SW. Sinus node dysfunction: pathophysiology, clinical features, evaluation, and treatment. Philadelphia 1995.
131. Adan V, Crown LA. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. American family physician. 2003;67(8):1725-32. Epub 2003/05/03.
132. Demoulin JC, Kulbertus HE. Histopathological correlates of sinoatrial disease. British heart journal. 1978;40(12):1384-9. Epub 1978/12/01.
133. Mangrum JM, DiMarco JP. The evaluation and management of bradycardia. The New England journal of medicine. 2000;342(10):703-9. Epub 2000/03/09.
134. Semelka M, Gera J, Usman S. Sick sinus syndrome: a review. American family physician. 2013;87(10):691-6. Epub 2013/08/14.
135. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. The Journal of clinical investigation. 2003;111(10):1537-45. Epub 2003/05/17.
136. Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. Circulation. 2007;116(5):463-70. Epub 2007/07/25.
137. Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, et al. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). The Journal of clinical investigation. 2003;112(7):1019-28. Epub 2003/10/03.
138. Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(24):9137-42. Epub 2004/06/05.
139. Milanese R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscone T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. The New England journal of medicine. 2006;354(2):151-7. Epub 2006/01/13.
140. Anderson JB, Benson DW. Genetics of sick sinus syndrome. Cardiac electrophysiology clinics. 2010;2(4):499-507. Epub 2011/04/19.
141. Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, Marek-Yagel D, Pras E, Dascal N, et al. A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. Journal of cardiovascular electrophysiology. 2010;21(12):1365-72. Epub 2010/07/29.
142. Wahls SA. Sick sinus syndrome. American family physician. 1985;31(3):117-24. Epub 1985/03/01.
143. Rodriguez RD, Schocken DD. Update on sick sinus syndrome, a cardiac disorder of aging. Geriatrics. 1990;45(1):26-30, 3-6. Epub 1990/01/01.
144. Bigger JT, Jr., Reiffel JA. Sick sinus syndrome. Annual review of medicine. 1979;30:91-118. Epub 1979/01/01.
145. Cecil RL, Goldman L, Schafer AI. Goldman's Cecil medicine. 24th<sup>e</sup> éd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
146. Lewis SL, Tam PP. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists. 2006;235(9):2315-29. Epub 2006/06/06.
147. Gilbert SF. Developmental biology. 9th<sup>e</sup> éd. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2010.

148. Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2011;240(3):501-20. Epub 2011/01/20.
149. Sbarbati R. Morphogenesis of the intestinal villi of the mouse embryo: chance and spatial necessity. *Journal of anatomy*. 1982;135(Pt 3):477-99. Epub 1982/10/01.
150. Geske MJ, Zhang X, Patel KK, Ornitz DM, Stappenbeck TS. Fgf9 signaling regulates small intestinal elongation and mesenchymal development. *Development (Cambridge, England)*. 2008;135(17):2959-68. Epub 2008/07/26.
151. Hatch J, Mukoyama YS. Spatiotemporal mapping of vascularization and innervation in the fetal murine intestine. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2015;244(1):56-68. Epub 2014/08/21.
152. Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(23):5317-28. Epub 2005/11/15.
153. Walton KD, Kolterud A, Czerwinski MJ, Bell MJ, Prakash A, Kushwaha J, et al. Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):15817-22. Epub 2012/09/29.
154. Bayha E, Jorgensen MC, Serup P, Grapin-Botton A. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PloS one*. 2009;4(6):e5845. Epub 2009/06/12.
155. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrissey EE, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134(13):2521-31. Epub 2007/05/25.
156. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Developmental cell*. 2009;16(4):588-99. Epub 2009/04/24.
157. Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mechanisms of development*. 2006;123(1):42-55. Epub 2005/12/06.
158. Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(8):1563-72. Epub 2000/03/22.
159. Roberts DJ. Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2000;219(2):109-20. Epub 2000/09/26.
160. Hikasa H, Sokol SY. Wnt signaling in vertebrate axis specification. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a007955. Epub 2012/08/24.
161. Christian JL, Gavin BJ, McMahon AP, Moon RT. Isolation of cDNAs partially encoding four *Xenopus* Wnt-1/int-1-related proteins and characterization of their transient expression during embryonic development. *Developmental biology*. 1991;143(2):230-4. Epub 1991/02/01.
162. McLin VA, Rankin SA, Zorn AM. Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134(12):2207-17. Epub 2007/05/18.
163. Kim BM, Buchner G, Miletich I, Sharpe PT, Shivdasani RA. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Developmental cell*. 2005;8(4):611-22. Epub 2005/04/06.

164. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics*. 1998;19(4):379-83. Epub 1998/08/11.
165. Chiacchiera F, Rossi A, Jammula S, Piunti A, Scelfo A, Ordonez-Moran P, et al. Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/beta-Catenin Transcriptional Activity. *Cell stem cell*. 2016;18(1):91-103. Epub 2015/11/04.
166. Das S, Yu S, Sakamori R, Vedula P, Feng Q, Flores J, et al. Rab8a vesicles regulate Wnt ligand delivery and Paneth cell maturation at the intestinal stem cell niche. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(12):2147-62. Epub 2015/05/28.
167. Farin HF, Van Es JH, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1518-29.e7. Epub 2012/08/28.
168. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development*. 2003;17(14):1709-13. Epub 2003/07/17.
169. Valenta T, Degirmenci B, Moor AE, Herr P, Zimmerli D, Moor MB, et al. Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell reports*. 2016;15(5):911-8. Epub 2016/04/28.
170. Theodosiou NA, Tabin CJ. Sox9 and Nkx2.5 determine the pyloric sphincter epithelium under the control of BMP signaling. *Developmental biology*. 2005;279(2):481-90. Epub 2005/03/01.
171. Narita T, Saitoh K, Kameda T, Kuroiwa A, Mizutani M, Koike C, et al. BMPs are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo: a study using virally induced BMP-2 and Noggin expression. *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(5):981-8. Epub 2000/02/09.
172. Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121(10):3163-74. Epub 1995/10/01.
173. Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development (Cambridge, England)*. 1998;125(15):2791-801. Epub 1998/07/10.
174. Marjoram L, Alvers A, Deerhake ME, Bagwell J, Mankiewicz J, Cocchiaro JL, et al. Epigenetic control of intestinal barrier function and inflammation in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(9):2770-5. Epub 2015/03/03.
175. Elliott EN, Kaestner KH. Epigenetic regulation of the intestinal epithelium. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(21):4139-56. Epub 2015/07/30.
176. Jorgensen BG, Berent RM, Ha SE, Horiguchi K, Sasse KC, Becker LS, et al. DNA methylation, through DNMT1, has an essential role in the development of gastrointestinal smooth muscle cells and disease. *Cell death & disease*. 2018;9(5):474. Epub 2018/04/28.
177. Ganz J, Melancon E, Wilson C, Amores A, Batzel P, Strader M, et al. Epigenetic factors Dnmt1 and Uhrf1 coordinate intestinal development. *Developmental biology*. 2019;455(2):473-84. Epub 2019/08/09.

178. Kim R, Sheaffer KL, Choi I, Won KJ, Kaestner KH. Epigenetic regulation of intestinal stem cells by Tet1-mediated DNA hydroxymethylation. *Genes & development*. 2016;30(21):2433-42. Epub 2016/11/20.
179. Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH. Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *The American journal of pathology*. 2010;177(1):21-8. Epub 2010/05/22.
180. Ning Y, Huang H, Dong Y, Sun Q, Zhang W, Xu W, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine inhibited PDGF-induced rat airway smooth muscle cell phenotypic switching. *Archives of toxicology*. 2013;87(5):871-81. Epub 2013/02/21.
181. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, Shen H, Byun HM, Van Den Berg D, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome research*. 2012;22(2):271-82. Epub 2011/06/11.
182. Sadler T, Bhasin JM, Xu Y, Barnholz-Sloan J, Chen Y, Ting AH, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clinical epigenetics*. 2016;8:30. Epub 2016/03/15.
183. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer research*. 2006;66(17):8462-9468. Epub 2006/09/05.
184. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer cell*. 2006;9(3):199-207. Epub 2006/03/15.
185. Ogino S, Nosh K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(23):1734-8. Epub 2008/11/27.
186. Torroglosa A, Alves MM, Fernandez RM, Antinolo G, Hofstra RM, Borrego S. Epigenetics in ENS development and Hirschsprung disease. *Developmental biology*. 2016;417(2):209-16. Epub 2016/06/21.
187. Ng JM, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2472-96. Epub 2015/01/27.
188. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology*. 2011;6:479-507. Epub 2010/11/26.
189. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature genetics*. 2004;36(4):417-22. Epub 2004/03/23.
190. Akhtar-Zaidi B, Cowper-Sal-lari R, Corradin O, Saiakhova A, Bartels CF, Balasubramanian D, et al. Epigenomic enhancer profiling defines a signature of colon cancer. *Science (New York, NY)*. 2012;336(6082):736-9. Epub 2012/04/14.
191. Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2009;6(4):228-35. Epub 2009/04/07.
192. Spagnolo P, Sverzellati N, Rossi G, Cavazza A, Tzouveleakis A, Crestani B, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *Annals of medicine*. 2015;47(1):15-27. Epub 2015/01/24.
193. Choi SS, Sicklick JK, Ma Q, Yang L, Huang J, Qi Y, et al. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;44(5):1267-77. Epub 2006/10/24.

194. Tarnawski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive diseases and sciences*. 2005;50 Suppl 1:S24-33. Epub 2005/09/27.
195. Goldstein AM, Hofstra RM, Burns AJ. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clinical genetics*. 2013;83(4):307-16. Epub 2012/11/22.
196. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(5):286-94. Epub 2012/03/07.
197. Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2005;41 Suppl 1:S4-6. Epub 2005/09/01.
198. Lake JI, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2013;305(1):G1-24. Epub 2013/05/04.
199. Kapur RP, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development (Cambridge, England)*. 1992;116(1):167-75. Epub 1992/09/01.
200. Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(1):349-58. Epub 1996/01/01.
201. Anderson RB, Stewart AL, Young HM. Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell and tissue research*. 2006;323(1):11-25. Epub 2005/09/01.
202. Young HM, Hearn CJ, Ciampoli D, Southwell BR, Brunet JF, Newgreen DF. A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Developmental biology*. 1998;202(1):67-84. Epub 1998/10/06.
203. Burns AJ, Douarin NM. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development (Cambridge, England)*. 1998;125(21):4335-47. Epub 1998/10/01.
204. Wang X, Chan AK, Sham MH, Burns AJ, Chan WY. Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology*. 2011;141(3):992-1002.e1-6. Epub 2011/06/28.
205. McHugh KM. Molecular analysis of gastrointestinal smooth muscle development. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1996;23(4):379-94. Epub 1996/11/01.
206. Uesaka T, Young HM, Pachnis V, Enomoto H. Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. *Developmental biology*. 2016;417(2):158-67. Epub 2016/04/27.
207. Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Developmental biology*. 2003;258(2):364-84. Epub 2003/06/12.
208. Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, Canty AJ, Thomas PQ, Newgreen DF. GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Developmental biology*. 2001;229(2):503-16. Epub 2001/01/11.
209. Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*. 2002;129(22):5151-60. Epub 2002/10/26.

210. Delalande JM, Barlow AJ, Thomas AJ, Wallace AS, Thapar N, Erickson CA, et al. The receptor tyrosine kinase RET regulates hindgut colonization by sacral neural crest cells. *Developmental biology*. 2008;313(1):279-92. Epub 2007/11/23.
211. Rao M, Gershon MD. The dynamic cycle of life in the enteric nervous system. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017;14:453.
212. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho H-J. The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. Dans: Lyte M, Cryan JF, rédacteurs. *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 39-71.
213. Yin J, Chen JD. Roles of interstitial cells of Cajal in regulating gastrointestinal motility: in vitro versus in vivo studies. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(4):1118-29. Epub 2008/04/24.
214. Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Paris: Maloine; 1909.
215. Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(4):1393-403. Epub 2000/02/09.
216. Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *The Journal of physiology*. 2001;537(Pt 1):237-50. Epub 2001/11/17.
217. Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(26):3239-48. Epub 2010/07/09.
218. Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Developmental biology*. 1996;180(1):97-107. Epub 1996/11/25.
219. Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 1999;11(5):311-38. Epub 1999/10/16.
220. Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(21):19191-7. Epub 2002/03/19.
221. Hennig GW, Spencer NJ, Jokela-Willis S, Bayguinov PO, Lee HT, Ritchie LA, et al. ICC-MY coordinate smooth muscle electrical and mechanical activity in the murine small intestine. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2010;22(5):e138-51. Epub 2010/01/12.
222. Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta histochemica et cytochemica*. 2006;39(6):145-53. Epub 2007/03/01.
223. Fox EA, Phillips RJ, Martinson FA, Baronowsky EA, Powley TL. Vagal afferent innervation of smooth muscle in the stomach and duodenum of the mouse: morphology and topography. *The Journal of comparative neurology*. 2000;428(3):558-76. Epub 2000/11/14.
224. Lee HT, Hennig GW, Fleming NW, Keef KD, Spencer NJ, Ward SM, et al. Septal interstitial cells of Cajal conduct pacemaker activity to excite muscle bundles in human jejunum. *Gastroenterology*. 2007;133(3):907-17. Epub 2007/08/07.
225. Huizinga JD. Action potentials in gastrointestinal smooth muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1991;69(8):1133-42. Epub 1991/08/01.



226. Barajas-Lopez C, Huizinga JD. Different mechanisms of contraction generation in circular muscle of canine colon. *The American journal of physiology*. 1989;256(3 Pt 1):G570-80. Epub 1989/03/01.
227. Lakatta EG, Vinogradova T, Lyashkov A, Sirenko S, Zhu W, Ruknudin A, et al. The integration of spontaneous intracellular Ca<sup>2+</sup> cycling and surface membrane ion channel activation entrains normal automaticity in cells of the heart's pacemaker. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1080:178-206. Epub 2006/11/30.
228. Takaki M, Suzuki H, Nakayama S. Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: ubiquitous pacemaker cells. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2010;102(2-3):129-35. Epub 2010/06/18.
229. Ozaki H, Stevens RJ, Blondfield DP, Publicover NG, Sanders KM. Simultaneous measurement of membrane potential, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and tension in intact smooth muscles. *The American journal of physiology*. 1991;260(5 Pt 1):C917-25. Epub 1991/05/01.
230. Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiological reviews*. 2014;94(3):859-907. Epub 2014/07/06.
231. Strege PR, Ou Y, Sha L, Rich A, Gibbons SJ, Szurszewski JH, et al. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;285(6):G1111-21. Epub 2003/08/02.
232. Shahi PK, Choi S, Zuo DC, Kim MY, Park CG, Kim YD, et al. The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal. *J Gastroenterol*. 2014;49(6):1001-10. Epub 2013/06/20.
233. Fujii K, Nakajo K, Egashira Y, Yamamoto Y, Kitada K, Taniguchi K, et al. Gastrointestinal Neurons Expressing HCN4 Regulate Retrograde Peristalsis. *Cell reports*. 2020;30(9):2879-88.e3. Epub 2020/03/05.
234. Xiao J, Nguyen TV, Ngui K, Strijbos PJ, Selmer IS, Neylon CB, et al. Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system. *Neuroscience*. 2004;129(3):603-14. Epub 2004/11/16.
235. Tse G, Lai ET, Yeo JM, Tse V, Wong SH. Mechanisms of Electrical Activation and Conduction in the Gastrointestinal System: Lessons from Cardiac Electrophysiology. *Frontiers in physiology*. 2016;7:182. Epub 2016/06/16.
236. Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *The Journal of physiology*. 1999;514 ( Pt 2)(Pt 2):515-31. Epub 1998/12/16.
237. Dickens EJ, Edwards FR, Hirst GD. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *The Journal of physiology*. 2001;531(Pt 3):827-33. Epub 2001/03/17.
238. Suzuki H, Hirst GD. Regenerative potentials evoked in circular smooth muscle of the antral region of guinea-pig stomach. *The Journal of physiology*. 1999;517 ( Pt 2)(Pt 2):563-73. Epub 1999/05/20.
239. Lammers WJ, Slack JR. Of slow waves and spike patches. *News Physiol Sci*. 2001;16:138-44. Epub 2001/07/10.
240. Boeckxstaens GE, Rumessen JJ, de Wit L, Tytgat GN, Vanderwinden JM. Abnormal distribution of the interstitial cells of cajal in an adult patient with pseudo-obstruction and megaduodenum. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(8):2120-6. Epub 2002/08/23.

241. Stanghellini V, Camilleri M, Malagelada JR. Chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction: clinical and intestinal manometric findings. *Gut*. 1987;28(1):5-12. Epub 1987/01/01.
242. Stanghellini V, Cogliandro RF, de Giorgio R, Barbara G, Salvioli B, Corinaldesi R. Chronic intestinal pseudo-obstruction: manifestations, natural history and management. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2007;19(6):440-52. Epub 2007/06/15.
243. Stanghellini V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Barbara G, Morselli-Labate AM, Cogliandro L, et al. Natural history of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction in adults: a single center study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2005;3(5):449-58. Epub 2005/05/10.
244. Amiot A, Joly F, Alves A, Panis Y, Bouhnik Y, Messing B. Long-term outcome of chronic intestinal pseudo-obstruction adult patients requiring home parenteral nutrition. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(5):1262-70. Epub 2009/04/16.
245. Lindberg G, Iwarzon M, Tornblom H. Clinical features and long-term survival in chronic intestinal pseudo-obstruction and enteric dysmotility. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2009;44(6):692-9. Epub 2009/03/25.
246. Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara L. Pseudo-obstruction syndromes. *Bailliere's clinical gastroenterology*. 1988;2(1):225-54. Epub 1988/01/01.
247. Di Lorenzo C. Pseudo-obstruction: current approaches. *Gastroenterology*. 1999;116(4):980-7. Epub 1999/03/26.
248. Gargiulo A, Auricchio R, Barone MV, Cotugno G, Reardon W, Milla PJ, et al. Filamin A is mutated in X-linked chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction with central nervous system involvement. *American journal of human genetics*. 2007;80(4):751-8. Epub 2007/03/16.
249. Lehtonen HJ, Sipponen T, Tojkander S, Karikoski R, Jarvinen H, Laing NG, et al. Segregation of a missense variant in enteric smooth muscle actin gamma-2 with autosomal dominant familial visceral myopathy. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1482-91.e3. Epub 2012/09/11.
250. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5402):689-92. Epub 1999/01/29.
251. Giordano C, Powell H, Leopizzi M, De Curtis M, Travaglini C, Sebastiani M, et al. Fatal congenital myopathy and gastrointestinal pseudo-obstruction due to POLG1 mutations. *Neurology*. 2009;72(12):1103-5. Epub 2009/03/25.
252. Bonora E, Bianco F, Cordeddu L, Bamshad M, Francescatto L, Dowless D, et al. Mutations in RAD21 disrupt regulation of APOB in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology*. 2015;148(4):771-82.e11. Epub 2015/01/13.
253. Kyndt F, Schott JJ, Trochu JN, Baranger F, Herbert O, Scott V, et al. Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *American journal of human genetics*. 1998;62(3):627-32. Epub 1998/04/29.
254. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, et al. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*. 2007;115(1):40-9. Epub 2006/12/28.
255. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular

- dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*. 1993;87(6):1854-65. Epub 1993/06/01.
256. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, et al. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*. 1993;329(13):921-5. Epub 1993/09/23.
257. Antonucci A, Fronzoni L, Cogliandro L, Cogliandro RF, Caputo C, De Giorgio R, et al. Chronic intestinal pseudo-obstruction. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14(19):2953-61. Epub 2008/05/22.
258. Thapar N, Saliakellis E, Benninga MA, Borrelli O, Curry J, Faure C, et al. Paediatric Intestinal Pseudo-obstruction: Evidence and Consensus-based Recommendations From an ESPGHAN-Led Expert Group. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2018;66(6):991-1019. Epub 2018/03/24.
259. Malagelada JR, Stanghellini V. Manometric evaluation of functional upper gut symptoms. *Gastroenterology*. 1985;88(5 Pt 1):1223-31. Epub 1985/05/01.
260. Emmanuel AV, Shand AG, Kamm MA. Erythromycin for the treatment of chronic intestinal pseudo-obstruction: description of six cases with a positive response. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004;19(6):687-94. Epub 2004/03/17.
261. Murr MM, Sarr MG, Camilleri M. The surgeon's role in the treatment of chronic intestinal pseudoobstruction. *The American journal of gastroenterology*. 1995;90(12):2147-51. Epub 1995/12/01.
262. Faure C, Goulet O, Ategbo S, Breton A, Tounian P, Ginies JL, et al. Chronic intestinal pseudoobstruction syndrome: clinical analysis, outcome, and prognosis in 105 children. *French-Speaking Group of Pediatric Gastroenterology. Digestive diseases and sciences*. 1999;44(5):953-9. Epub 1999/05/11.
263. Bortolotti M. Gastric electrical stimulation for gastroparesis: a goal greatly pursued, but not yet attained. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(3):273-82. Epub 2011/01/22.
264. Bouchard G, Roy R, Casgrain B, Hubert M. [Population files and database management: the BALSAC database and the INGRES/INGRID system]. *Histoire & mesure*. 1989;4(1-2):39-57. Epub 1989/01/01. Fichier de population et structures de gestion de base de donnees: le fichier-reseau BALSAC et le systeme INGRES/INGRID.
265. Nasmyth K. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual review of genetics*. 2001;35:673-745. Epub 2001/11/09.
266. Piche JVV, PP.; Puceat, M.; Andelfinger, G. The expanding phenotypes of cohesinopathies: One ring to rule them all! *Cell Cycle*, Under revision.
267. Gutierrez-Caballero C, Cebollero LR, Pendas AM. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends in genetics : TIG*. 2012;28(7):351-60. Epub 2012/05/01.
268. Haering CH, Lowe J, Hochwagen A, Nasmyth K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular cell*. 2002;9(4):773-88. Epub 2002/05/02.
269. Kudo NR, Anger M, Peters AH, Stemmam O, Theussl HC, Helmhart W, et al. Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 15):2686-98. Epub 2009/07/25.

270. Mehta GD, Kumar R, Srivastava S, Ghosh SK. Cohesin: functions beyond sister chromatid cohesion. *FEBS letters*. 2013;587(15):2299-312. Epub 2013/07/09.
271. Kerrebrock AW, Moore DP, Wu JS, Orr-Weaver TL. Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell*. 1995;83(2):247-56. Epub 1995/10/20.
272. Rabitsch KP, Gregan J, Schleiffer A, Javerzat JP, Eisenhaber F, Nasmyth K. Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Current biology : CB*. 2004;14(4):287-301. Epub 2004/02/20.
273. Salic A, Waters JC, Mitchison TJ. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell*. 2004;118(5):567-78. Epub 2004/09/02.
274. Tomoaki Kahyo HS. SGO1 (shugoshin-like 1 (*S. pombe*)) : Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology; 2013 ; . Disponible: [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_SGO1.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_SGO1.html)
275. Mohr L, Buheitel J, Schöckel L, Karalus D, Mayer B, Stemmann O. An Alternatively Spliced Bifunctional Localization Signal Reprograms Human Shugoshin 1 to Protect Centrosomal Instead of Centromeric Cohesin2015.
276. Xu Z, Cetin B, Anger M, Cho US, Helmhart W, Nasmyth K, et al. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Molecular cell*. 2009;35(4):426-41. Epub 2009/09/01.
277. Tsukahara T, Tanno Y, Watanabe Y. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*. 2010;467(7316):719-23. Epub 2010/08/27.
278. Herzog F, Kahraman A, Boehringer D, Mak R, Bracher A, Walzthoeni T, et al. Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6100):1348-52. Epub 2012/09/18.
279. Kang J, Chaudhary J, Dong H, Kim S, Brautigam CA, Yu H. Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(8):1181-90. Epub 2011/02/25.
280. Jeyaprakash AA, Basquin C, Jayachandran U, Conti E. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure (London, England : 1993)*. 2011;19(11):1625-34. Epub 2011/10/29.
281. McGuinness BE, Hirota T, Kudo NR, Peters JM, Nasmyth K. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS biology*. 2005;3(3):e86. Epub 2005/03/02.
282. Kitajima TS, Hauf S, Ohsugi M, Yamamoto T, Watanabe Y. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Current biology : CB*. 2005;15(4):353-9. Epub 2005/02/23.
283. Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, et al. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nature cell biology*. 2008;10(1):42-52. Epub 2007/12/18.
284. Zachariae W. Progression into and out of mitosis. *Current opinion in cell biology*. 1999;11(6):708-16. Epub 1999/12/22.
285. Lampson MA, Cheeseman IM. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends in cell biology*. 2011;21(3):133-40. Epub 2010/11/26.
286. Perera D, Taylor SS. Sgo1 establishes the centromeric cohesion protection mechanism in G2 before subsequent Bub1-dependent recruitment in mitosis. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 5):653-9. Epub 2010/02/04.

287. Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner JB, Liu ST, Kao GD, et al. Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *The Journal of cell biology*. 2007;177(3):413-24. Epub 2007/05/09.
288. Boyarchuk Y, Salic A, Dasso M, Arnaoutov A. Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *The Journal of cell biology*. 2007;176(7):919-28. Epub 2007/03/29.
289. Suzuki H, Akiyama N, Tsuji M, Ohashi T, Saito S, Eto Y. Human Shugoshin mediates kinetochore-driven formation of kinetochore microtubules. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2006;5(10):1094-101. Epub 2006/05/12.
290. Pouwels J, Kukkonen AM, Lan W, Daum JR, Gorbsky GJ, Stukenberg T, et al. Shugoshin 1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007;6(13):1579-85. Epub 2007/07/10.
291. Fu G, Ding X, Yuan K, Aikhionbare F, Yao J, Cai X, et al. Phosphorylation of human Sgo1 by NEK2A is essential for chromosome congression in mitosis. *Cell research*. 2007;17(7):608-18. Epub 2007/07/11.
292. Indjeian VB, Stern BM, Murray AW. The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5706):130-3. Epub 2005/01/08.
293. Wang X, Yang Y, Duan Q, Jiang N, Huang Y, Darzynkiewicz Z, et al. sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Developmental cell*. 2008;14(3):331-41. Epub 2008/03/12.
294. Koscielny G, Yaikhom G, Iyer V, Meehan TF, Morgan H, Atienza-Herrero J, et al. The International Mouse Phenotyping Consortium Web Portal, a unified point of access for knockout mice and related phenotyping data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D802-9. Epub 2013/11/07.
295. Song AT, Galli A, Leclerc S, Nattel S, Mandato C, Andelfinger G. Characterization of Sgo1 expression in developing and adult mouse. *Gene expression patterns : GEP*. 2017;25-26:36-45. Epub 2017/05/04.
296. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology*. 2013;2(1):47-63. Epub 2013/06/27.
297. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2001;29(2):117-29. Epub 2001/10/05.
298. R. Derynck KM. The TGF-beta family. Press CSHL, rédacteur2007.
299. Cell Signaling Technology I. TGF- $\beta$  / Smad Signaling Interactive Pathway : ; . Disponible: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-stem-cell-markers/tgf-smad-signaling-interactive-pathway/pathways-tgfb>
300. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13:616.
301. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84. Epub 2003/10/10.
302. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994;370(6488):341-7. Epub 1994/08/04.
303. Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massague J. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Molecular cell*. 2001;8(3):671-82. Epub 2001/10/05.

304. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700. Epub 2003/06/18.
305. Xu L, Kang Y, Col S, Massague J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular cell*. 2002;10(2):271-82. Epub 2002/08/23.
306. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(3):169-78. Epub 2001/03/17.
307. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*. 1997;389(6651):622-6. Epub 1997/10/23 22:33.
308. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631-5. Epub 1997/10/23 22:33.
309. Ravichandran KS. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*. 2001;20(44):6322-30. Epub 2001/10/19.
310. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(6):740-6. Epub 2003/12/04.
311. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*. 2006;172(7):973-81. Epub 2006/03/29.
312. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development*. 1999;13(7):804-16. Epub 1999/04/10.
313. Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(44):41361-8. Epub 2002/08/24.
314. Matsuura I, Wang G, He D, Liu F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry*. 2005;44(37):12546-53. Epub 2005/09/15.
315. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal*. 2005;24(19):3353-9. Epub 2005/09/09.
316. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001;412(6844):346-51. Epub 2001/07/19.
317. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(3):1429-32. Epub 1997/01/17.
318. Zhang L, Wang W, Hayashi Y, Jester JV, Birk DE, Gao M, et al. A role for MEK kinase 1 in TGF-beta/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *The EMBO journal*. 2003;22(17):4443-54. Epub 2003/08/28.
319. Kim KY, Kim BC, Xu Z, Kim SJ. Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29478-84. Epub 2004/04/08.
320. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell research*. 2008;19:128.
321. Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1782(4):197-228. Epub 2008/03/04.

322. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(3):469-74. Epub 2012/01/10.
323. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *The New England journal of medicine*. 2006;355(8):788-98. Epub 2006/08/25.
324. Horbelt D, Guo G, Robinson PN, Knaus P. Quantitative analysis of TGFBR2 mutations in Marfan-syndrome-related disorders suggests a correlation between phenotypic severity and Smad signaling activity. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 24):4340-50. Epub 2010/11/26.
325. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352(6333):337-9. Epub 1991/07/25.
326. Saharinen J, Keski-Oja J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(8):2691-704. Epub 2000/08/10.
327. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(4):2750-7. Epub 2002/11/14.
328. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nature genetics*. 2003;33(3):407-11. Epub 2003/02/25.
329. Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGFbeta signaling and disease. *FEBS letters*. 2012;586(14):2003-15. Epub 2012/05/30.
330. Shprintzen RJ, Goldberg RB. A recurrent pattern syndrome of craniosynostosis associated with arachnodactyly and abdominal hernias. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*. 1982;2(1):65-74. Epub 1982/01/01.
331. Robinson PN, Neumann LM, Demuth S, Enders H, Jung U, Konig R, et al. Shprintzen-Goldberg syndrome: fourteen new patients and a clinical analysis. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;135(3):251-62. Epub 2005/05/11.
332. Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, Maragh S, Lindsay ME, Schepers D, et al. Mutations in the TGF-beta repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nature genetics*. 2012;44(11):1249-54. Epub 2012/10/02.
333. Batut J, Schmierer B, Cao J, Raftery LA, Hill CS, Howell M. Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Development (Cambridge, England)*. 2008;135(17):2927-37. Epub 2008/08/14.
334. Nyati S, Schinske-Sebolt K, Pitchiaya S, Chekhovskiy K, Chator A, Chaudhry N, et al. The kinase activity of the Ser/Thr kinase BUB1 promotes TGF-beta signaling. *Science signaling*. 2015;8(358):ra1. Epub 2015/01/08.
335. Soardi FC, Machado-Silva A, Linhares ND, Zheng G, Qu Q, Pena HB, et al. Familial STAG2 germline mutation defines a new human cohesinopathy. *NPJ genomic medicine*. 2017;2:7. Epub 2017/12/22.
336. Tomkins DJ, Siskin JE. Abnormalities in the cell-division cycle in Roberts syndrome fibroblasts: a cellular basis for the phenotypic characteristics? *American journal of human genetics*. 1984;36(6):1332-40. Epub 1984/11/01.
337. Summers KM. Relationship between genotype and phenotype in monogenic diseases: relevance to polygenic diseases. *Human mutation*. 1996;7(4):283-93. Epub 1996/01/01.

338. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends in genetics : TIG*. 1999;15(7):267-72. Epub 1999/07/03.
339. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(4):245-55. Epub 2001/04/03.
340. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nature genetics*. 1996;12(4):348-50. Epub 1996/04/01.
341. Romeo G, McKusick VA. Phenotypic diversity, allelic series and modifier genes. *Nature genetics*. 1994;7(4):451-3. Epub 1994/08/01.
342. Dorsett D. Roles of the sister chromatid cohesion apparatus in gene expression, development, and human syndromes. *Chromosoma*. 2007;116(1):1-13. Epub 2006/07/05.
343. Dorsett D. Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila*. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2009;17(2):185-200. Epub 2009/03/25.
344. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 2010;467(7314):430-5. Epub 2010/08/20.
345. Zhang B, Jain S, Song H, Fu M, Heuckeroth RO, Erlich JM, et al. Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134(17):3191-201. Epub 2007/07/27.
346. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, Krantz ID, Musio A. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in Cornelia de Lange syndrome. *Human mutation*. 2013;34(12):1589-96. Epub 2013/09/17.
347. Doughan AR, Williams BR. Cardiac sarcoidosis. *Heart (British Cardiac Society)*. 2006;92(2):282-8. Epub 2006/01/18.
348. Gerke AK, Hunninghake G. The immunology of sarcoidosis. *Clinics in chest medicine*. 2008;29(3):379-90, vii. Epub 2008/06/10.
349. Hunninghake GW, Fulmer JD, Young RC, Jr., Gadek JE, Crystal RG. Localization of the immune response in sarcoidosis. *The American review of respiratory disease*. 1979;120(1):49-57. Epub 1979/07/01.
350. Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23. Epub 2010/03/05.
351. Kumar R, Corbett MA, Van Bon BW, Gardner A, Woenig JA, Jolly LA, et al. Increased STAG2 dosage defines a novel cohesinopathy with intellectual disability and behavioral problems. *Human molecular genetics*. 2015;24(25):7171-81. Epub 2015/10/08.
352. Smith CW, Pritchard K, Marston SB. The mechanism of Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(1):116-22. Epub 1987/01/05.
353. Elsafadi M, Manikandan M, Dawud RA, Alajez NM, Hamam R, Alfayez M, et al. Transgelin is a TGFbeta-inducible gene that regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of human skeletal stem cells through actin cytoskeleton organization. *Cell death & disease*. 2016;7(8):e2321. Epub 2016/08/05.
354. Je HD, Sohn UD. SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice. *Molecules and cells*. 2007;23(2):175-81. Epub 2007/04/28.

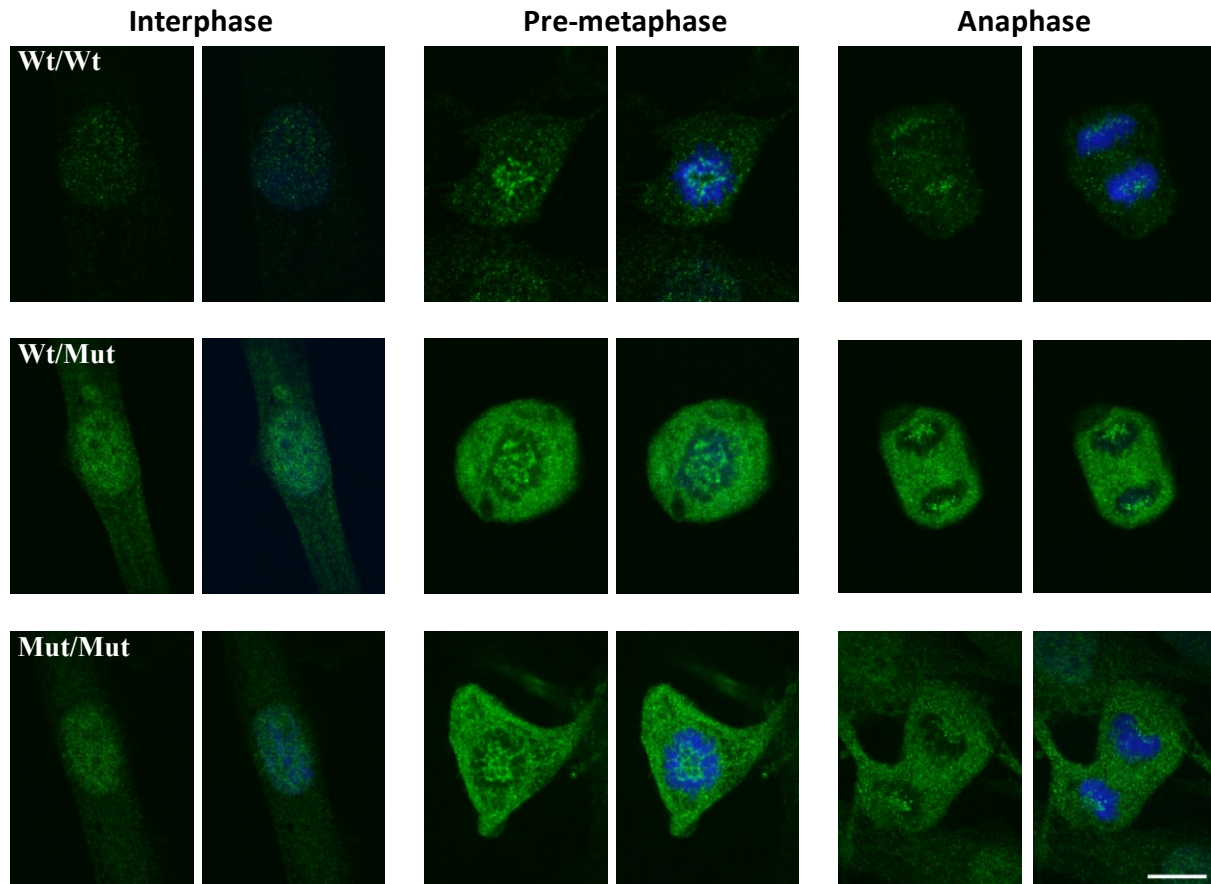


355. Prunotto M, Bruschi M, Gunning P, Gabbiani G, Weibel F, Ghiggeri GM, et al. Stable incorporation of alpha-smooth muscle actin into stress fibers is dependent on specific tropomyosin isoforms. *Cytoskeleton* (Hoboken, NJ). 2015;72(6):257-67. Epub 2015/07/07.
356. Wang J, Huang Y, Ning Q. Review on regulation of inwardly rectifying potassium channels. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2011;21(4):303-11. Epub 2011/12/21.
357. Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annual review of physiology*. 1996;58:363-94. Epub 1996/01/01.
358. Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature*. 2002;419(6903):132-3. Epub 2002/09/13.
359. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation research*. 1993;73(2):379-85. Epub 1993/08/01.
360. Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, et al. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(3):381-8. Epub 2002/08/07.
361. Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*. 2001;105(4):511-9. Epub 2001/05/24.
362. Flynn ER, McManus CA, Bradley KK, Koh SD, Hegarty TM, Horowitz B, et al. Inward rectifier potassium conductance regulates membrane potential of canine colonic smooth muscle. *The Journal of physiology*. 1999;518(Pt 1):247-56. Epub 1999/06/22.
363. Huang X, Lee SH, Lu H, Sanders KM, Koh SD. Molecular and functional characterization of inwardly rectifying K(+) currents in murine proximal colon. *The Journal of physiology*. 2018;596(3):379-91. Epub 2017/12/06.
364. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(11):633-45. Epub 2012/09/12.
365. Gramley F, Lorenzen J, Koellensperger E, Kettering K, Weiss C, Munzel T. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: the role of the TGF-beta1 signaling pathway. *International journal of cardiology*. 2010;143(3):405-13. Epub 2009/04/28.
366. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006;118(1):10-24. Epub 2006/04/25.
367. Wei W, Jiao Y, Postlethwaite A, Stuart JM, Wang Y, Sun D, et al. Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. *Genes and immunity*. 2013;14(1):1-6. Epub 2012/11/30.
368. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*. 2012;489(7415):313-7. Epub 2012/08/14.
369. Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, Hurtado A, Brown GD, Carroll JS, et al. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome research*. 2010;20(5):578-88. Epub 2010/03/12.
370. Mannini L, F CL, Cucco F, Amato C, Quarantotti V, Rizzo IM, et al. Mutant cohesin affects RNA polymerase II regulation in Cornelia de Lange syndrome. *Scientific reports*. 2015;5:16803. Epub 2015/11/20.

371. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. 2008;451(7180):796-801. Epub 2008/02/01.
372. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.
373. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell stem cell*. 2010;6(5):479-91. Epub 2010/05/11.
374. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer cell*. 2014;26(4):577-90. Epub 2014/09/30.
375. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. 2010;466(7303):253-7. Epub 2010/07/09.
376. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(7):484-92. Epub 2012/05/30.
377. Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic acids research*. 2001;29(22):4598-606. Epub 2001/11/20.
378. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*. 2017;171(1):34-57. Epub 2017/09/25.
379. Yang M, Gocke CB, Luo X, Borek D, Tomchick DR, Machius M, et al. Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase. *Molecular cell*. 2006;23(3):377-87. Epub 2006/08/04.
380. Levkau B, Schafers M, Wohlschlaeger J, von Wnuck Lipinski K, Keul P, Hermann S, et al. Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation*. 2008;117(12):1583-93. Epub 2008/03/12.
381. Schrickel JW, Lickfett L, Lewalter T, Tiemann K, Nickenig G, Baba H, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of survivin causes global cardiac conduction defects. *Basic research in cardiology*. 2012;107(6):299. Epub 2012/09/15.
382. Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. Survivin expression increases during aging and enhances the resistance of aged human fibroblasts to genotoxic stress. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2013;35(3):549-62. Epub 2012/01/19.
383. Kalman JM, Lee RJ, Fisher WG, Chin MC, Ursell P, Stillson CA, et al. Radiofrequency catheter modification of sinus pacemaker function guided by intracardiac echocardiography. *Circulation*. 1995;92(10):3070-81. Epub 1995/11/15.
384. Euler DE, Jones SB, Gunnar WP, Loeb JM, Murdock DK, Randall WC. Cardiac arrhythmias in the conscious dog after excision of the sinoatrial node and crista terminalis. *Circulation*. 1979;59(3):468-75. Epub 1979/03/01.
385. Thakur SS, Geiger T, Chatterjee B, Bandilla P, Frohlich F, Cox J, et al. Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(8):M110.003699. Epub 2011/05/19.
386. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(3):204-20. Epub 2013/02/13.

387. Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(3):191-203. Epub 2010/02/04.
388. Tatovic DT, Lappyyova JL, Mahajan TM. Gestational diabetes in Gloucestershire Royal Hospital: Have we got the correct blood glucose targets for commencing insulin treatment? *Diabet Med*. 2009;26:80.
389. Babenko VN, Chadaeva IV, Orlov YL. Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC evolutionary biology*. 2017;17(Suppl 1):19. Epub 2017/03/03.
390. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*. 2009;41(2):178-86. Epub 2009/01/20.
391. Heyn H, Vidal E, Ferreira HJ, Vizoso M, Sayols S, Gomez A, et al. Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. *Genome biology*. 2016;17:11. Epub 2016/01/28.
392. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(7):497-510. Epub 2013/06/14.
393. Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nature reviews Genetics*. 2018;19(5):299-310. Epub 2018/02/27.
394. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Science translational medicine*. 2017;9(386). Epub 2017/04/21.
395. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nature communications*. 2017;8:15824. Epub 2017/06/13.
396. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 2011;470(7332):105-9. Epub 2010/12/15.
397. Watson CL, Mahe MM, Munera J, Howell JC, Sundaram N, Poling HM, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nature medicine*. 2014;20(11):1310-4. Epub 2014/10/20.
398. Workman MJ, Mahe MM, Trisno S, Poling HM, Watson CL, Sundaram N, et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature medicine*. 2017;23(1):49-59. Epub 2016/11/22.
399. Bengtsson M, Hammar O, Mandl T, Ohlsson B. Evaluation of gastrointestinal symptoms in different patient groups using the visual analogue scale for irritable bowel syndrome (VAS-IBS). *BMC gastroenterology*. 2011;11:122. Epub 2011/11/15.
400. Lindberg G. Pseudo-obstruction, enteric dysmotility and irritable bowel syndrome. Best practice & research *Clinical gastroenterology*. 2019;40-41:101635. Epub 2019/10/09.

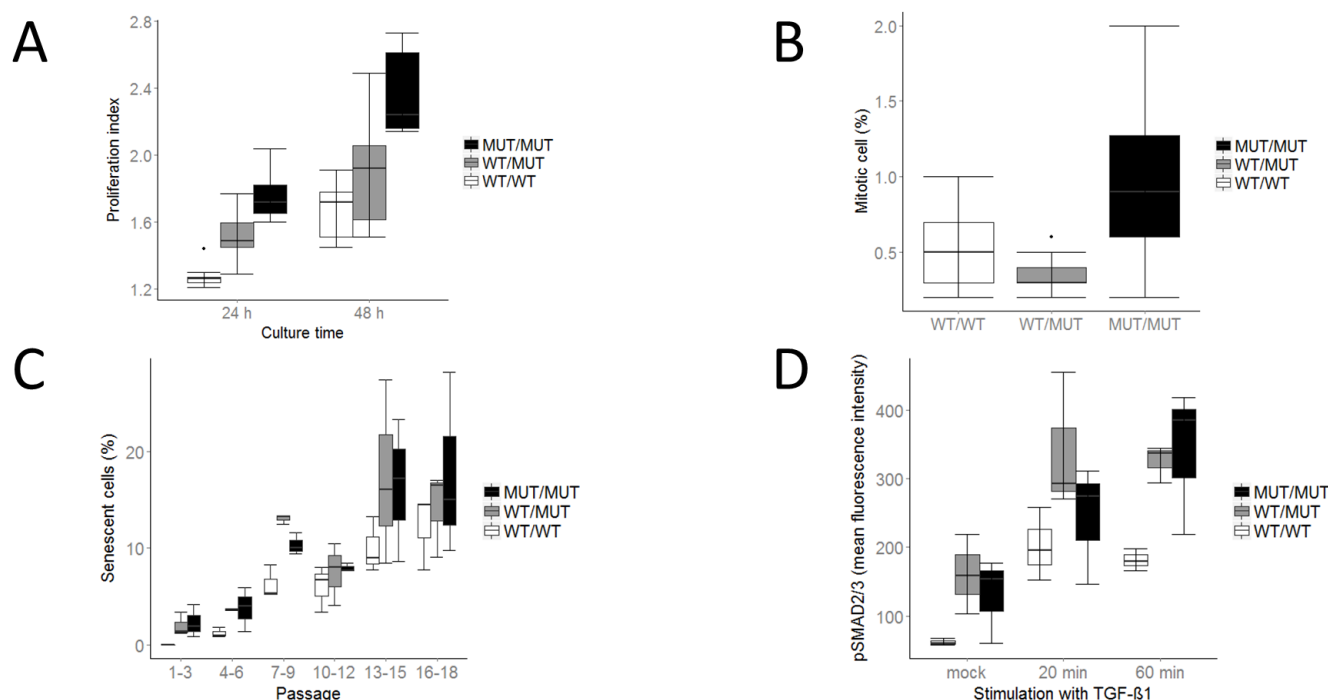
## Annexe 1 : Caractérisation du patron d'expression de SGO1 dans les fibroblastes de sujets contrôle, hétérozygote et homozygote pour la mutation K23E.



**Figure 1. Analyse par microscopie confocale du patron d'expression de SGO1 pendant la mitose dans les fibroblastes de peau des patients CAID.** Comparaison d'un contrôle de type sauvage avec une lignée hétérozygote et une lignée homozygote et pour la mutation *SGO1* K23E (n=3). La protéine SGO1 se localise correctement dans la région centromérique au cours de la prémétaphase et de l'anaphase, mais présente un patron de localisation cytosolique anormal au niveau des fibroblastes hétérozygotes et homozygotes. Panneau de gauche: Vert, marquage de SGO1. Panneau de droite : Vert et bleu, SGO1 et Hoechst. Scale bar, 10  $\mu$ m (1).

Au niveau cellulaire, on remarque que les hétérozygotes présentent un patron de localisation de SGO1 similaire à celui des homozygotes. Ceci indique qu'au niveau cellulaire, une seule copie mutée de *SGO1* semble suffire pour avoir un phénotype alors que ce n'est pas le cas au niveau de l'organisme entier puisque les individus hétérozygotes ne sont pas atteints du syndrome CAID.

## Annexe 2 : Caractérisation des phénotypes cellulaires des fibroblastes contrôles, hétérozygotes et homozygotes pour la mutation SGO1 K23E.



**Figure 1. Phénotypes cellulaires du syndrome CAID.** De manière générale, les lignées hétérozygotes présentent un phénotype intermédiaire entre les lignées contrôles et les lignées homozygotes. **A)** Les lignées cellulaires hétérozygotes et homozygotes montrent un indice de prolifération significativement plus élevé à 24h et 48h de culture par rapport aux lignées contrôles. **B)** Le pourcentage de cellules en mitose est également significativement plus élevé chez ces lignées. **C)** La sénescence est accélérée chez les lignées hétérozygotes et homozygotes par rapport aux lignées contrôles. **D)** La phosphorylation de SMAD2/3 est significativement plus élevée chez les hétérozygotes et les homozygotes en comparaison aux lignées contrôles (résultats non publiés).

Au niveau cellulaire, en ce qui a trait à la prolifération, le nombre de cellules en mitose, la sénescence et l'activation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ , les hétérozygotes pour la mutation *SGO1* K23E présentent un phénotype intermédiaire entre les contrôles et les individus homozygotes. Bien que les individus hétérozygotes ne soient pas atteints du syndrome CAID, certains d'entre eux ont présenté certaines caractéristiques, sans toutefois avoir le phénotype

complet. Il semble donc plausible que le dosage génique joue un rôle important dans l'effet de la mutation *SGO1* K23E.

### Annexe 3 : Top 10 des gènes différentiellement régulés (ARNm) chez les fibroblastes de peau des patients CAID à passage précoce (p8) et tardif (p14)

**Tableau 1. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage précoce (p8) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.**

Les gènes en gris représentent ceux dont les fonctions ou les maladies associées ont un intérêt potentiel pour expliquer le syndrome CAID.

Gènes	Fonctions	Maladies associées	Log <sub>2</sub> FC	FDR
PAX8-AS1	Long ARN non codant	1-Leucémie lymphocytaire aiguë de l'enfant 2-Cancer du col utérin	-4.18	0.08
KCND2	Canal potassique impliqué dans la régulation de la conduction cardiaque	1-Syndrome du QT long 2-Encéphalopathie myoclonique précoce	-4.17	0.09
PPL	Composant de l'enveloppe cornée des kératinocytes	1-Pemphigus 2-Pemphigus paranéoplasique	-3.23	0.09
GATA6-AS1	Long ARN non codant	1-Leucémie 2-Cancer lymphocytaire chronique 3-cancer gastrique	-3.22	0.08
MYBPH	Composant structural des muscles	1-Protéinurie orthostatique 2-Rougeole	-3.14	0.07
FAIM2	Antiapoptotique, possiblement impliqué dans le développement des cellules de Purkinje	1-Pneumonite de ventilation	-3.10	0.07
INMT	Impliqué dans le métabolisme du tryptophane.	1-Angiokératome du carcinome à petites cellules de Fordyce 2-Carcinome de la prostate	-2.97	0.07
ABCA8	Transporteur ABC qui régule le métabolisme des lipides	1-Ichtyose congénitale 2-Ichtyose autosomique récessive 4B 3-Ichtyose autosomique récessive congénitale	-2.91	0.06
WNT2	Régulation du devenir et de la structuration des cellules pendant l'embryogenèse	1-Maladie de Peyronie 2-Cancer colorectal	-2.84	0.08
DEPTOR	Régulateur négatif des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2.	1-Sclérose tubéreuse 1 2-Sclérose tubéreuse 2	-2.82	0.07

AS1 : ARNm anti-sens. Conventionnellement non considéré dans l'analyse.

FC : Fold change

FDR : FDR-adjusted P value (q value) <0.1

**Tableau 2. 10 gènes les plus différentiellement surexprimés à passage précoce (p8) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.**

Les gènes en gris représentent ceux dont les fonctions ou les maladies associées ont un intérêt potentiel pour expliquer le syndrome CAID.

Gènes	Fonctions	Maladies associées	Log <sub>2</sub> FC	FDR
WTAPP1	Pseudogène	1-Tumeur de Wilms 1	3.47	0.07
EMB	Impliqué dans la croissance des motoneurons et dans la formation des jonctions neuromusculaires	1-Manifestation splénique de la leucémie 2-Mycose systémique primaire	3.59	0.09
EGFLAM	Impliqué dans la formation de synapses du ruban photorécepteur rétinien et dans les fonctions physiologiques de la perception visuelle	1-Adiaspiromycose 2-Dystrophie musculaire-dystroglycanopathie	3.64	0.06
CACNG4	Régule les canaux calciques de type L qui contiennent CACNA1C	-	4.01	0.09
SPESP1	Impliqué dans la capacité de fertilisation des spermatozoïdes	1-Schistose 2-Lésions pulmonaires	4.35	0.08
GPR37	Récepteur de la prosaposine, facteur neuroprotecteur et glioprotecteur	1-Parkinson 2-troubles du spectre de l'autisme	4.59	0.10
G0S2	Favorise l'apoptose en se liant au BCL2, empêchant ainsi la formation d'hétérodimères protecteurs BCL2-BAX	-	4.59	0.06
CAMK1G	Kinase dépendante du calcium et de la calmoduline dont la fonction exacte est inconnue	-	5.06	0.09
TDRD9	Hélicase d'ARN se liant à l'ATP nécessaire pendant la spermatogenèse	1-Échec spermatogénique 2- Infertilité masculine avec azoospermie ou oligozoospermie en raison de la mutation d'un seul gène	5.15	0.05
PSMB8	Sous-unité du protéasome	1-Syndrome auto-inflammatoire associé au protéasome 2-Syndrome de Nakajo	5.51	0.10

AS1 : ARNm anti-sens. Conventionnellement non considéré dans l'analyse.

FC : Fold change



FDR : FDR-adjusted P value (q value) <0.1

**Tableau 3. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage tardif (p14) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.**

Les gènes en gris représentent ceux dont les fonctions ou les maladies associées ont un intérêt potentiel pour expliquer le syndrome CAID.

Gènes	Fonctions	Maladies associées	Log <sub>2</sub> FC	FDR
PPP1R11	Impliqué dans la régulation de la libération de cytokines inflammatoires	-	-5.12	0.03
MYBPH	Composant structural des muscles	1-Protéinurie orthostatique 2-Rougeole	-5.10	0.05
PAX8-AS1	Long ARN non codant	1-Leucémie lymphocytaire aiguë de l'enfant 2-Cancer du col utérin	-5.09	0.04
HLA-DMA	Joue un rôle central dans le chargement des molécules du CMH de classe II	1-Sarcoïdose cardiaque 2-Rougeole	-4.79	0.07
ADD2	Protéine associée au cytosquelette membranaire qui favorise l'assemblage du réseau spectrine-actine et qui interagit avec la calmoduline	1-Elliptocytose héréditaire 2-Actinomycose	-4.36	0.04
ADH1B	Métabolisme de l'alcool	1-Dépendance à l'alcool 2-Cirrhose hépatique alcoolique	-4.31	0.06
FAM225B	Long ARN non codant	-	-3.89	0.03
CDH8	Impliqués dans l'adhésion synaptique, la croissance des axones et le guidage	1-Troubles d'apprentissage 2-Tumeur épithéliale de Wilms prédominante	-3.82	0.05
SEC14L5	Transporteur dont la fonction précise est inconnue	1-Ataxie spinocérébelleuse 2-Trouble du stress post-traumatique	-3.76	0.06
ZNRD1	Sous-unité de l'ARN polymérase I dirigée par l'ADN qui joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire	1-Cancer gastrique	-3.57	0.05

AS1 : ARNm anti-sens. Conventionnellement non considéré dans l'analyse.

FC : Fold change

FDR : FDR-adjusted P value (q value) <0.1

**Tableau 4. 10 gènes les plus différentiellement sous exprimés à passage tardif (p14) chez les fibroblastes de peau des patients CAID.**

Les gènes en gris représentent ceux dont les fonctions ou les maladies associées ont un intérêt potentiel pour expliquer le syndrome CAID.

Gènes	Fonctions	Maladies associées	Log <sub>2</sub> FC	FDR
MAP3K9	Une fois activé, agit comme un activateur en amont de la cascade de transduction du signal MKK/JNK par la phosphorylation de MAP2K4/MKK4 et MAP2K7/MKK7 qui à son tour activent les JNK	1-Carcinome rétropéritonéal 2-Neuroblastome rétropéritonéal	4.67	0.04
GSTM1	Désintoxication des composés électrophiles, y compris les substances cancérogènes, les médicaments thérapeutiques, les toxines environnementales et les produits du stress oxydatif	1-Asbestose 2-Leucoplasie orale	4.73	0.10
TDRD9	Hélicase d'ARN se liant à l'ATP nécessaire pendant la spermatogenèse	1-Échec spermatogénique 2- Infertilité masculine avec azoospermie ou oligozoospermie en raison de la mutation d'un seul gène	4.77	0.06
CACNG4	Régule les canaux calciques de type L qui contiennent CACNA1C	-	4.82	0.02
MYH6	Myosine cardiaque impliquée dans la contraction musculaire	1-Défaut septal auriculaire 2-Cardiomyopathie dilatée	4.82	0.05
PSMB8	Sous-unité du protéasome	1-Syndrome auto-inflammatoire associé au protéasome 2-Syndrome de Nakajo	4.84	0.09
SPESP1	Impliqué dans la capacité de fertilisation des spermatozoïdes	1-Schistose 2-Lésions pulmonaires	5.12	0.05
GPR37	Récepteur de la prosaposine, facteur neuroprotecteur et glioprotecteur	1-Parkinson 2-troubles du spectre de l'autisme	5.25	0.04
HBA2	Sous-unité de l'hémoglobine	1-Alpha-Thalassémie 2-Maladie de l'hémoglobine D	6.89	0.05
HBB	Sous-unité de l'hémoglobine	1-Bêta-Thalassémie 2-Anémie falciforme	7.46	0.06

AS1 : ARNm anti-sens. Conventionnellement non considéré dans l'analyse.

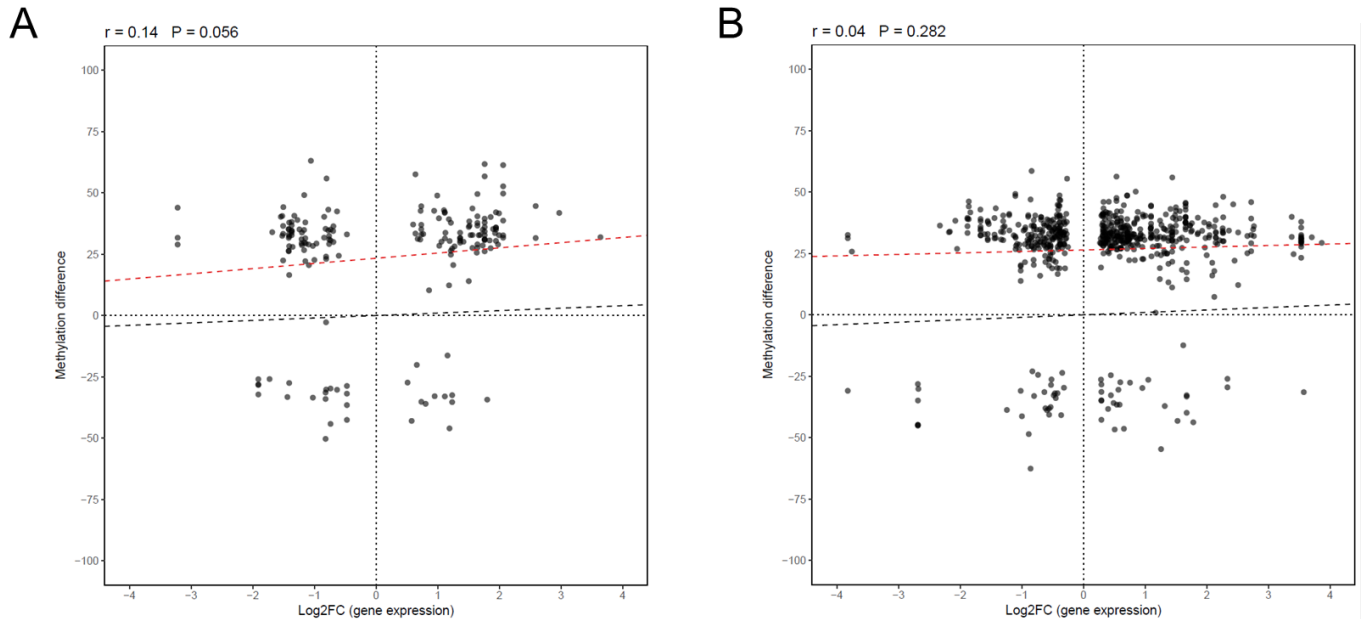
FC : Fold change

FDR : FDR-adjusted P value (q value) <0.1

En plus d'avoir mis en évidence l'implication probable de la conduction cardiaque et de la contraction musculaire dans le pathomécanisme du syndrome CAID, l'analyse des 10 gènes les plus différentiellement exprimés à la hausse et à la baisse pour les deux passages étudiés a

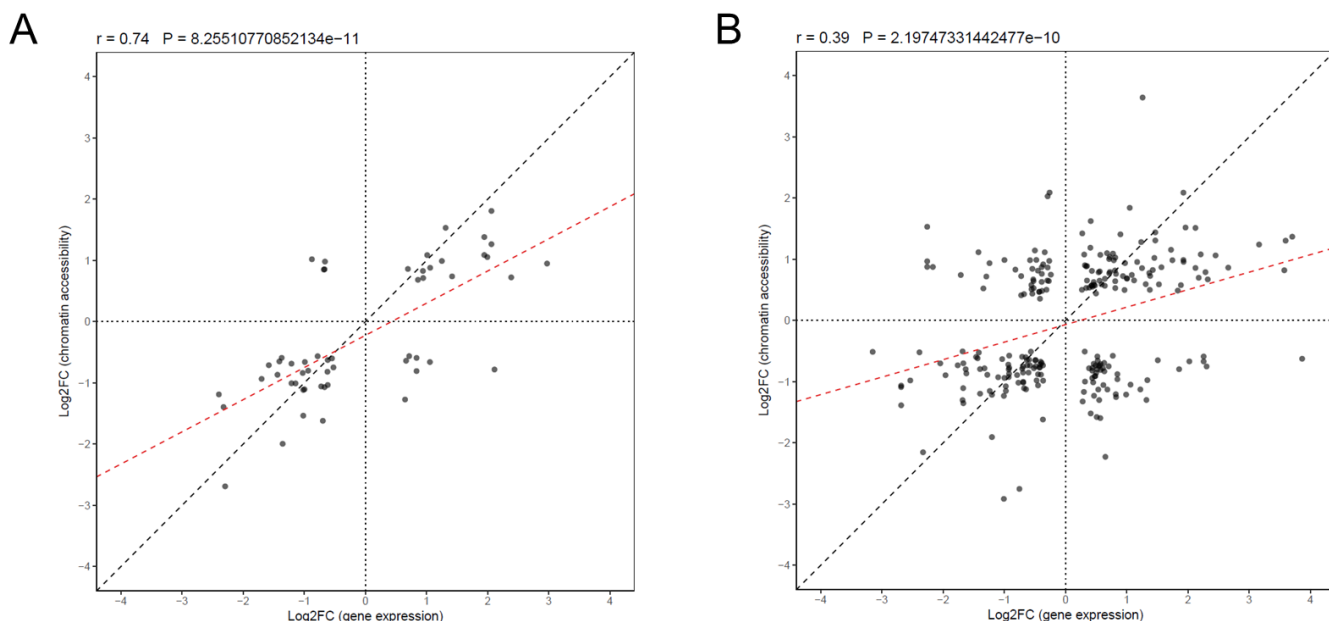
également permis de mettre en évidence l'implication possible mais aussi inattendue, de la réponse immunitaire.

## Annexe 4 : Corrélations des analyses de méthylation de l'ADN et de compaction de la chromatine avec les analyses de transcriptomique



**Figure 1. Corrélations entre les analyses de méthylation de l'ADN et les analyses de transcriptomique à passage précoce (p8) (A) et à passage tardif (p14) (B).** Seuls les gènes différentiellement régulés et les régions différentiellement méthylées ont été considérés.

La méthylation de l'ADN est généralement associée à la répression génique. Or, autant à passage précoce (p8) qu'à passage tardif (p14), aucune corrélation n'a été trouvée dans notre étude. Ceci met en évidence le fait que la méthylation de l'ADN ne va pas toujours de pair avec la répression génique et que bien d'autres mécanismes sont impliqués. En effet, la localisation de la méthylation au niveau des différentes régions du génome peut avoir des effets différents.



**Figure 2. Corrélations entre les analyses de compaction de la chromatine et les analyses de transcriptomique à passage précoce (p8) (A) et à passage tardif (p14) (B).** Seuls les gènes différentiellement régulés et les régions différentiellement accessibles ont été considérés.

La compaction de la chromatine est généralement associée à la répression génique. Dans notre étude, une corrélation acceptable a été trouvée à passage précoce (p8) et à passage tardif (p14) entre la compaction de la chromatine et la transcription génique.

Il faut toutefois faire preuve de prudence avec l'interprétation des analyses de corrélations présentées aux figures 1 et 2. Il ne faut pas perdre de vue que les différentes techniques employées couvrent des parties différentes du génome. Il est donc très difficile d'étudier la corrélation, car dans plusieurs cas, une région couverte par une analyse ne l'est pas par l'autre.

## **Annexe 5 : Résultats de quantification des marques d'histones**

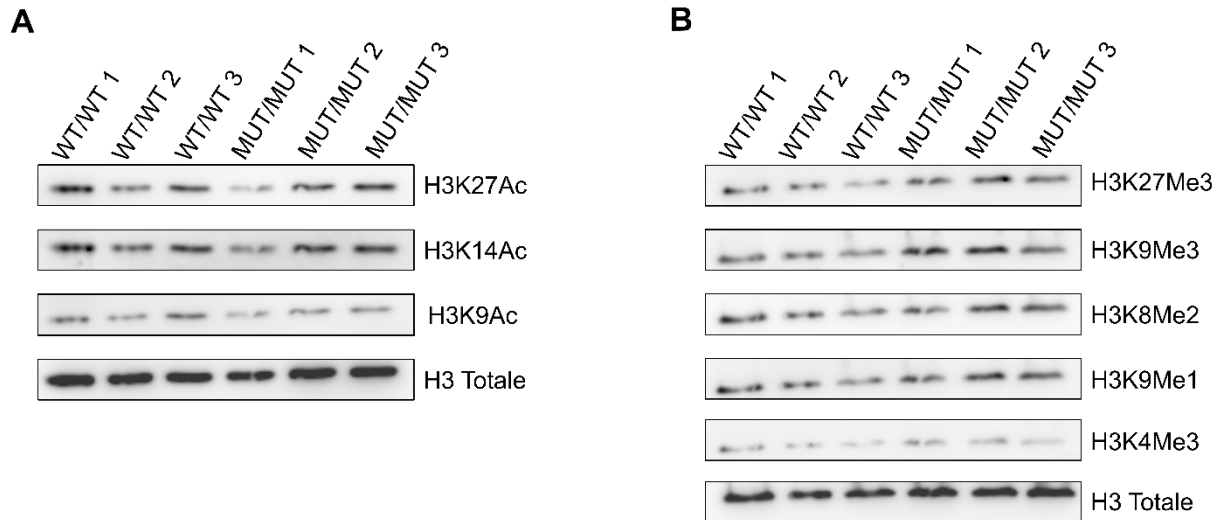
### **Méthodologie**

*Culture cellulaire et extraction des histones.* Des fibroblastes provenant de 3 patients CAID et de 3 contrôles de type sauvage ont été ensemencés dans du DMEM + 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% de Pénicilline/Streptomycine (P/S) au passage 5. Les cellules ont été cultivées jusqu'à p8 pour obtenir 12 T-75 pour chaque lignée cellulaire (environ 4 à 5 millions de cellules). Les cellules ont été récoltées à confluence autour de 80% et lavées 2 fois avec 1 ml de Phosphate Buffered Saline (PBS) supplémenté (0.1 µg/ml de PMSF, 10mM Butyrate de sodium, 5 mM NaF, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) froid. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 2 000 g, 5 min à 4 ° C. Le culot cellulaire a été conservé à -80°C. Les cellules ont été resuspendues dans le tampon d'extraction Triton (TEB: PBS contenant 0,5% de Triton X-100 (v/v), 2 mM de PMSF, 0,02% (p/v) de NaN<sub>3</sub>) à une densité cellulaire de 107 cellules par ml, lysées sur glace pendant 10 min avec faible agitation et centrifuger à 2000g pendant 10 min à 4 ° C. Les cellules ont été lavées de nouveau avec la moitié du volume de TEB et centrifugées de nouveau. Le culot a été remis en suspension dans du HCl 0,2 N à une densité cellulaire de 4x10<sup>7</sup> cellules par ml toute la nuit à 4°C et a été centrifugé 2000g pendant 10 min à 4 ° C. La teneur en protéines du surnageant, contenant les histones, a été déterminée par Bradford.

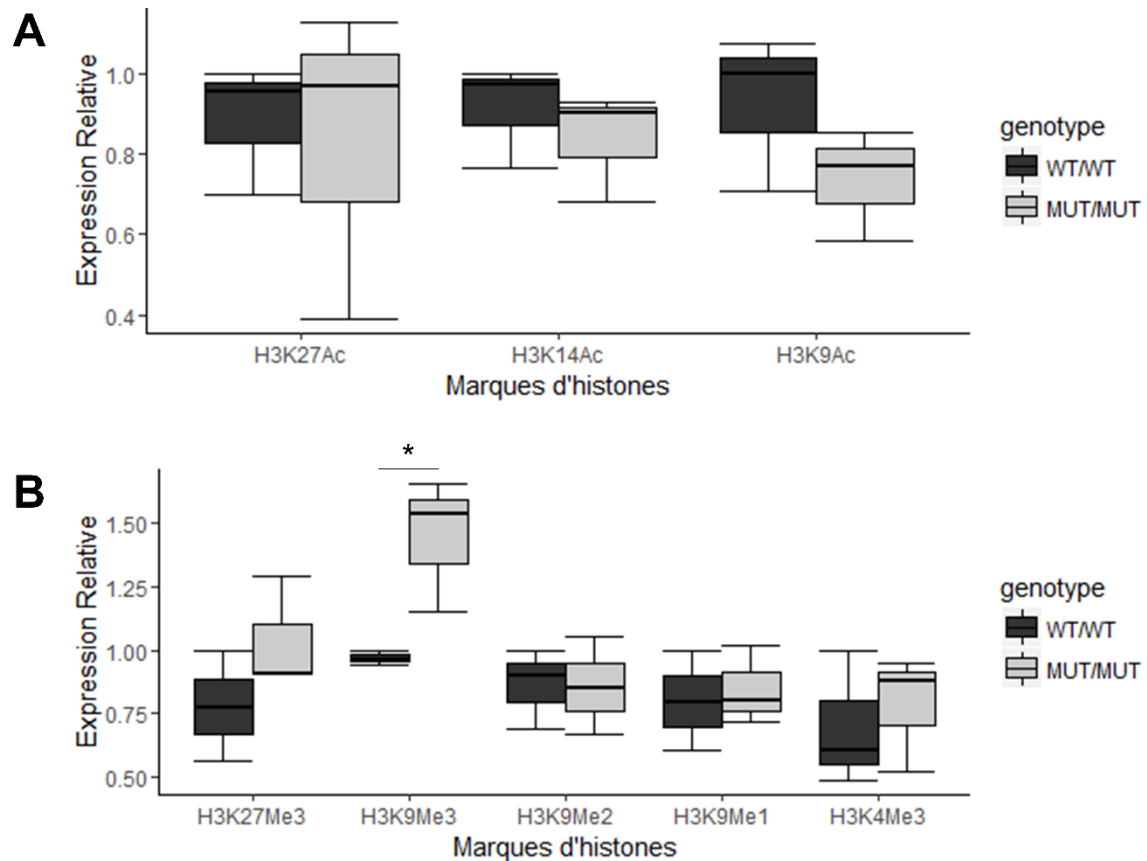
*Quantification des marques d'histones.* 30 µg de protéines ont été chargés sur un gel SDS-PAGE à 12% et transférés sur une membrane en PVDF. La membrane a été incubée avec des anticorps primaires ciblant différentes marques d'histones associées à l'ouverture et la fermeture de la chromatine, H3K27Ac (Dilution 1 :2500, #39134, Active Motif, lapin), H3K14Ac (Dilution 1:5000, #39698, Active Motif, lapin), H3K9Ac (Dilution 1 :5000, #39917, Active Motif, lapin), H3K27me3 (Dilution 1:5000, #39155, Active Motif, lapin), H3K9me3 (Dilution 1:2500, #39765, Active Motif, lapin), H3K9 me2 (Dilution 1:5000, # 39753, Active Motif, lapin), H3K9me1 (Dilution 1:5000, #39887, Active Motif, lapin), H3K4me3(Dilution 1:2500, # 39915, Active Motif, lapin) et H3 total (Dilution 1:5000, #39763, Active Motif, souris) toute la nuit à 4°C et incubé 1h à température pièce avec des anticorps secondaires

conjugués à la Horseradish peroxidase (HRP). Les membranes ont été développées avec du ECL standard (Biorad). L'intensité du signal a été quantifiée à l'aide d'ImageJ (v.1.48).

## Résultats



**Figure 1. Western blots des marques d'histones.** Acétylation (H3K27Ac, H3K14Ac et H3K9Ac) (A) et Méthylation (H3K27Me3, H3K9Me3, H3K8Me2, H3K9Me1 et H3K4Me3) (B) dans les fibroblastes de patients CAID (N=3) et de contrôles de type sauvage (N=3).



**Figure 2. Quantification densitométrique des Western blots des marques d'histones.** Acétylation (H3K27Ac, H3K14Ac et H3K9Ac) (A) et méthylation (H3K27Me3, H3K9Me3, H3K9Me2, H3K9Me1 et H3K4Me3) (B) dans les fibroblastes de patients CAID (N=3) et de contrôles de type sauvage (N=3). Barres d'erreurs S.D., La signifiante statistique a été calculée par ANOVA à un facteur avec un post-test de Bonferroni (\* =  $P < 0.05$ ).

L'analyse des marques d'acétylation et de méthylation dans les fibroblastes de patients CAID montre une augmentation significative de la méthylation de H3K9me3 ainsi qu'une légère augmentation de la méthylation de H3K27me3, soit les principales marques associées à la compaction de la chromatine, ce qui concorde avec le patron de fermeture de la chromatine observé par ATAC-seq.